

2012年12月22日提出

## 日本版 BMV (LBA) ガイドライン項目案、及び、各項目の概略説明

### 1. 適用

本文案を作成し、別資料に記載いたしました。

### 2. 標準物質（標準品）

低分子と基本的には類似した内容を記載する。

### 3. 分析法バリデーション

#### 3.1 フルバリデーション

低分子ガイドラインと同様の考え方を記載する。マトリックスの選択、最低希釈倍率についても記載する。

EMA ガイドラインでは、バリデーションにおける評価項目の一つとして最低希釈倍率を取り上げられているが、希釈倍率は試験条件の一つとして事前に設定されるものであり、バリデーション中に評価されるものではないため、本ガイドラインでは、フルバリデーションに関する説明の中に記載することとした。

また、市販キットを使用する場合でも測定施設でバリデーションを実施することを記載する。

#### 3.1.1 特異性

#### 3.1.2 選択性

低分子ガイドラインでは、“選択性”の究極の形と位置付けられた“特異性”が削除されたが、LBA では、マトリックス成分の存在下で分析対象物質を検出する“選択性”とは別の項目として、類似物質や併用薬等の関連分子の存在下で分析対象物質を検出する“特異性”の評価が行われている。LBA では、LC/MS を用いる分析と異なり、対象薬物の構造情報を直接得ることができないため、バリデーションあるいは分析法確立の際に実施する“特異性”の評価が重要であるので、“特異性”を“選択性”とは別項目として記載する方向で考えている。

#### 3.1.3 検量線

“定量下限”の項目は設けず、定量下限は“検量線”の項目に記載する。LBA では高濃度でシグナルが飽和する場合があるため、定量上限についても記載する。定量下限未満の濃度、定量上限を超える濃度であるアンカーポイントの設定についても記載する。

#### 3.1.4 真度および精度

LBA 特有の考え方はなく、基本的には低分子と同じである。ただし、ULQC を実施すること、測定回数、評価基準は低分子と異なる。

### 3.1.5 希釈直線性

定量上限を越える濃度の分析対象物質が試料中に含まれる場合でも、希釈により適切に分析できることを示すことを目的とする。そのために、定量上限を超える濃度の QC サンプルを希釈した際に希釈倍率と得られた実測濃度との間に直線関係があること、かつ、得られた濃度に希釈倍率を乗じた値が QC サンプルの真値になることと併せて、定量上限を超える濃度の QC サンプルにおけるシグナル低下 (Prozone、Hook effect) の有無を評価することを記載する。

### 3.1.6 安定性

低分子と基本的に同じとするが、プレートを用いる LBA では試料が一斉に処理されるので、分析中の試料の安定性については通常評価しない (低分子の“前処理後試料中安定性”に該当する評価は行わない)。

## 3.2 パーシャルバリデーション

低分子と基本的に同じとする。

## 3.3 クロスバリデーション

低分子と基本的に同じとする。ただし評価基準は低分子と異なる。

## 4. 実試料分析

### 4.1 分析法の妥当性

#### 4.1.1 検量線

適否の判定基準が異なる他は、低分子と基本的に同じとする。

#### 4.1.2 QC 試料

適否の判定基準が異なる他は、低分子と基本的に同じとする。

#### 4.1.3 ISR

適否の判定基準が異なる他は、低分子と基本的に同じとする。

### 4.2 注意事項

#### 4.2.1 定量範囲

LBA は一般に、低分子の chromatographic assay と比較して定量範囲が狭く、定量範囲を変更するためには、大幅な分析法の変更が必要となるケースが多いため、定量範囲を変更する際には、通例、フルバリデーションが必要であることを記載する。

#### 4.2.2 再分析

低分子と基本的に同じとする。

#### 4.2.3 キャリーオーバー

ELISA などプレートで測定する LBA では、キャリーオーバーという概念はないが、Biacore や Gyrolab など一部の分析法では、キャリーオーバーに関する注意が必要である

ことを記載する。前処理ロボットによるキャリーオーバーについては記載の有無について今後検討する。

#### 4.2.4 クロストーク

マイクロプレートで蛍光や発光を検出する場合、隣接するウェルからの光の漏れにより生じるクロストークに注意すべきことを記載する。

#### 4.2.5 重要試薬 (Critical reagent)

標準物質以外の測定結果に重大な影響を与える試薬 (抗体など) の管理等について、ロット変更の際の留意点などを含め、記載する。

#### 4.2.6 平行性 (Parallelism)

平行性は、段階希釈した実試料の分析を行い、用量反応曲線を検量線と比較することにより評価する。EMA ガイドラインでは平行性 (parallelism) の項目があるが、その評価の必要性については GBC 等でも議論がされているところであるので、国際動向も見極めて記載内容を検討する。

#### 4.2.7 干渉物質

実試料中に抗薬物抗体や可溶性抗原など定量に影響を与える因子が存在する可能性について考慮すべきであることを記載する。

### 5. 文書化

#### 5.1 バリデーション報告書

低分子と基本的に同じとするが、“分析方法 (試験条件)” の項に希釈倍率を記載すべきであることを記載する。

#### 5.2 実試料分析報告書

低分子と基本的に同じとする。

#### 5.3 記録の保存

低分子と基本的に同じとする。

用語解説

以上

## 1. 適用

本ガイドラインは、トキシコキネティクス試験及び臨床試験における生体試料中薬物濃度分析法としてリガンド結合法 (ligand binding assay: LBA) を用いる際の分析法バリデーション並びに当該分析法を用いた実試料分析に適用するものとする。対象薬物はペプチド及びタンパク質が中心となるが、リガンド結合法を用いて分析する薬物であれば低分子化合物も対象とする。リガンド結合法の代表的な例としては、酵素免疫測定法 (enzyme immunoassay: EIA) 等の抗原抗体反応に基づく免疫学的測定法が挙げられる。

ガイドライン項目比較

| (低分子) LC/MS ガイドライン  | (高分子) リガンド結合法ガイドライン: 今回提案  |
|---|--|
| 1.はじめに  |  |
| 2.適用  | 1.適用   |
| 3.標準物質 (標準品)  | 2.標準物質 (標準品)   |
| 4.分析法バリデーション<br>4.1.フルバリデーション<br>4.1.1 選択性(特異性)<br>4.1.2 定量下限<br>4.1.3 検量線<br>4.1.4 真度及び精度<br>4.1.5 マトリックス効果<br>4.1.6 回収率<br>4.1.7 キャリーオーバー<br>4.1.8 希釈妥当性<br>4.1.9 安定性<br>4.2 パーシャルバリデーション<br>4.3 クロスバリデーション | 3. 分析法バリデーション<br>3.1.フルバリデーション<br>3.1.1 特異性<br>3.1.2 選択性<br>3.1.3 検量線<br>3.1.4 真度及び精度<br><br>3.1.5 希釈直線性<br>3.1.6 安定性<br>3.2 パーシャルバリデーション<br>3.3 クロスバリデーション                        |
| 5.実試料分析<br>5.1 実試料分析における分析法の妥当性と再現性<br>5.1.1 検量線<br>5.1.2 QC 試料<br>5.1.3 ISR<br>5.1.4 キャリーオーバー<br>5.2 注意事項<br>5.2.1 定量範囲<br>5.2.2 再分析<br>5.2.3 クロマトグラムの波形処理<br>5.2.4 システム適合性                                  | 4. 実試料分析<br>4.1 分析法の妥当性<br>4.1.1 検量線<br>4.1.2 QC 試料<br>4.1.3 ISR<br>4.2 注意事項<br>4.2.1 定量範囲<br>4.2.2 再分析<br>4.2.3 キャリーオーバー<br>4.2.4 クロストーク<br>4.2.5 重要試薬<br>4.2.6 平行性<br>4.2.7 干渉物質 |
| 6. 文書化<br>6.1 バリデーション報告書<br>6.2 実試料分析報告書<br>6.3 記録の保存   | 5. 文書化<br>5.1 バリデーション報告書<br>5.2 実試料分析報告書<br>5.3 記録の保存  |
| 関連ガイドライン一覧  |  |
| 用語解説  | 用語解説   |
| 別添  |  |

## 「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」

研究分担者：大野 泰雄（国立医薬品食品衛生研究所 所長）

### 研究要旨

医薬品開発段階での安全性評価に利用することを目的に、前年度までに心臓毒性、筋肉毒性、神経毒性、肝傷害・肝脂肪化、肺炎及び血管炎、精巣毒性及び腎臓毒性に関するバイオマーカーについて文献的調査を行った。今年度は、平成24年度に公開された資料に基づき追加調査を行うとともに、新たに骨毒性、消化管毒性及び腎臓毒性について調査した。

心筋傷害のバイオマーカーとしては、Tn類の有用性が臨床において頻用されている。非臨床領域でも、主に急性心筋傷害モデルにおいて測定され、病理組織変化と対応する結果が得られていた。一方、Tnは心筋だけでなく骨格筋等にも存在（sTnI）することから、心筋傷害のバイオマーカーとしては心筋特異的なTn（cTnT、cTnI）が測定されていた。一方、cTnIが心不全状態ではない関節リウマチ（RA）患者においても上昇していることが報告され、潜在性（無痛性）の心筋傷害を検出している可能性があると考えられた。心筋梗塞モデルでは血中のmiR-208aや133aの発現が1000倍近く上昇した。即ち、miRNAは既知のマーカーに比し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。

骨格筋マーカーとしてsTnIが測定されているが、slow twitch skeletal muscle troponin Iとfast twitch skeletal muscle troponin Iの両方に反応するラット用の測定キット（電気化学発光免疫法）が市販されており、今後ヒト用の開発が期待される。

神経毒性については、脳損傷等の外傷性患者でのS100 $\beta$  protein測定結果についての報告が散見された。S100 $\beta$ は尿中や唾液等からも検出され、臨床応用が拡大される可能性が示唆された。なお、心毒性発現時にもS100 $\beta$ が変動することが知られており、神経損傷時の上昇とどのように区別するかの検討が必要である。その他の脳損傷マーカーとして、NSE（neuron specific enolase）、GFAP（glial fibrillary acidic protein）、MAP（Microtubule-associated proteins）-2が報告された。

肝臓毒性のバイオマーカーとしては、miRNAがヒトへの外挿性という点で優れており、報告数が多くなる傾向がみられたが、近年血中や尿中の安定性に問題があるとの報告もあり、過去のデータの解釈について注意する必要があると思われた。

炎症のバイオマーカーに関しては、2012年も既知のマーカーを検証する報告がみられたが、バイオマーカーとしての適格性が確認できた新規の毒性・副作用マーカーの報告は見つからず、炎症領域においては信頼性のあるバイオマーカーの探索の困難さが伺われた。

精巣毒性については、新たにイメージング手法に関して調査したが、新たな報告はなく、病理組織学的検査に代わる鋭敏な評価系は報告されなかった。

骨傷害については、臨床・非臨床を問わず、種々のバイオマーカーが盛んに利用されていた。また、臨床及び非臨床において、骨代謝マーカーを含む各種測定項目が記載されて

いる骨粗鬆症ガイドラインが存在する。これらは、骨疾患の機構に応じて適切な骨バイオマーカーを選択するうえで有用な情報源である。今後も様々な骨バイオマーカー候補が取り上げられると思われるが、それらを採用する際に考慮すべき点を考察した。

消化管傷害については、臨床で消化管機能検査に使用されているマーカーが主に報告されていた。粘膜傷害を検出するための非侵襲的な血中マーカー等も探索されているものの、鋭敏かつ正確に傷害が検出可能と考えられるマーカーは見当たらなかった。

腎毒性については、hL-FABPがヒトでの腎障害を検出するために感度が良い指標であることが示された。

今後は、今までにリストアップされたバイオマーカーについて、臨床及び非臨床試験での有用性や開発状況について整理する必要がある。

キーワード：バイオマーカー、国際的整合性、ICH、安全性評価

## 研究協力者

高橋 光一（久光製薬（株）研究開発本部基礎研究所薬理チーム）

田口和彦、本山径子、荻野大和、下元貴澄、戸和秀一、韓 大健、友廣雅之、佐々木正治、小林章男、鈴木 睦（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）

宇山 佳明（医薬品医療機器総合機構 レギュラトリーサイエンス推進部研究課長）

熊谷 雄治（北里大学東病院 治験管理センター）

## 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捉えるか、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、安全性評価に関わるバイオマーカーでは、副作用（毒性）の程

度が軽症で可逆的なうちに検出できる感度の高いマーカーが望ましい。また、選択性が高く、測定が容易なものが望ましい。真の臨床指標に替わるバイオマーカーの確立は、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り、様々なアプローチで新規毒性バイオマーカーが開発されている<sup>1)</sup>。米国では国と企業とが協力し、バイオマーカーコンソーシアムを設立し、そのようなバイオマーカーの開発に努めている。一方、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。

本研究では平成22年及び23年度において、心臓・筋肉・神経・肝傷害、肝脂肪化、肺炎及び血管炎、精巣毒性に関わるバイオマーカー情報を過去11年間遡って検索し、有用と思われるものを抽出・報告した。

今年度は、前年度からの継続調査として、2012年度に公開された論文を検索し、前年度までの調査分と照らし合わせ、新規性がある箇所を中心に詳細な調査を実施した。

課題1. 心臓・筋肉・神経毒性

調査担当者：高橋光一

## B. 研究方法

MEDLINEあるいはEMBASEを用いて2012年度に発行された文献を検索した(2012.12)。

([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、162、105、162件であった。

この中から、今回の目的とは趣旨の異なる論文は除外し、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。

### C-1) 心臓

#### Troponin (Tn) 類

心筋傷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Tn類の有用性が認知され、頻用されている。非臨床領域でも、主に実験的急性心筋傷害モデルにおいて測定されている。一方、Tnは心筋以外、骨格筋等にも存在(sTnI)することから、心筋傷害のバイオマーカーとしては心筋特異的なTn(cTnT、cTnI)が測定されている。

Tonomuraらは、ラットにisoproterenol等で心筋傷害を惹起した後に、各種マーカーと病理組織学的変化の相関性、データベース(Tissue-specific Gene Expression and Regulation: TiGER)

(<http://bioinfo.wilmer.jhu.edu/tiger/>)を用いたマーカーの組織分布との相関性、複数マーカーを用いたROC解析の結果を報告<sup>2)</sup>した。動物実験での病理組織学的変化とTiGERによるマーカーの組織分布とは、概ね一致していた。一方、心筋傷害を惹起する薬物により、測定項目(cTnT、cTnI、sTnI、FABP3、MYL3、AST、LDH、CK)の変動に差を認めた。また、心傷害を認めない状態でもcTnTが上昇している場合があり、さらなる考察が必要である。

Bradhamらは、cTnIが心不全状態でない関節リウマチ(RA)患者においても上昇していることを報告した<sup>3)</sup>。cTnIは高感度測定により検出されており、cTnIの上昇はRAの病態を反映するということより、

潜在性(無痛性)の心筋傷害を検出している可能性があるとした。

#### miRNA

miRNA(micro-RNA)とは、遺伝子発現を調節する効果を持つ21~25塩基程度の一本鎖RNAを示す。miRNAは、毒性マーカーとして臓器別に種々報告されている<sup>4)</sup>。

心臓においては、昨年度報告<sup>5)</sup>したとおりmiRNAが心筋傷害性に働く場合と心保護作用を有する場合の相反する作用を有しており、いずれも微細な組織変化でも鋭敏な変化を示す。例えば、心筋梗塞モデルでは血中のmiR-208aや133aの発現が1000倍近く上昇する<sup>6)</sup>。したがって、既知のマーカーに比し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。但し、miRNAの変動は、そのピーク幅、ピークまでの時間(Tmax)および持続時間にヒトも含め種差を認めている<sup>6)</sup>。

バイオマーカーとしてのmiRNAは、マトリックス中での安定性等の面で課題があるものの、傷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。

一方、miRNA関連医薬品開発も盛んに行われているが、非臨床段階がほとんどであり、実用化には暫く時間を要する<sup>7-8)</sup>。

#### FDA

文献調査の結果ではないが、現在FDAでは非臨床での薬物誘発心毒性バイオマーカーを実地評価(使用動物は不明)している

(<http://www.accessdata.fda.gov/FDA/track/track-proj?program=nctr&id=NCTR-DSB-PM-Develop-Biomarkers-of-Toxicity-and-Disease>)。FDAでは心毒性以外、肝毒性等の実地評価も実施している。いずれの毒性評価においても、ゲノミクスやメタボロミクスバイオマーカーが対象になっていることから、新規物質が同定される可能性が高く、今後の動向が注目される。

### C-2) 筋肉

平成22年度にfatty acid binding protein 3 (Fabp3)、

miR-133a、fast-twitch skeletal muscle troponin I (fnTnI) について報告した。今年度はこのマーカーを中心にフォローアップしたが、本年度も調査結果として対象となる論文数が少なかった。

心臓の項で前述したとおり、骨格筋マーカーとしてsTnIを測定しているが、Muscle Injury Panel 1 (rat) Kit ([http://www.mesoscale.com/CatalogSystemWeb/Documents/Muscle\\_Injury\\_Panel\\_1\\_rat.pdf](http://www.mesoscale.com/CatalogSystemWeb/Documents/Muscle_Injury_Panel_1_rat.pdf)) が用いられている。sTnIは、電気化学発光免疫法を用いて測定されており<sup>9)</sup>、soleus (slow twitch) とquad (fast twitch) の両方に反応する。sTnIはラット測定用のみが市販されており、今後ヒト用の測定開発が期待される。

### C-3) 神経

前年度までに、SBDP ( $\alpha$ -II-Spectrin Break Down Product)、Cleaved-Tau、S100 $\beta$  Protein、Myelin Basic Protein (MBP) について報告しており、今年度もこれらのマーカーを中心にフォローアップした。

S100 $\beta$ proteinに関しては、脳損傷等の外傷性患者での臨床報告が散見されている<sup>10-16)</sup>。また、脳虚血ダメージ時のマーカーもレビューされている<sup>17)</sup>。

一方、血液以外のサンプルからもS100 $\beta$ が検出され、疾患を反映することが報告されている<sup>18)</sup>。即ち、S100 $\beta$ は尿中や唾液等からも検出されることから、臨床への応用が広がる可能性を示唆している。

一方、ラットにおけるアミトリプチリン誘発毒性発現時にはS100 $\beta$ が変動することを認めており<sup>19)</sup>、心血管系の毒性予測に有用としている。S100 $\beta$ は心筋細胞にも発現していることが知られており、神経損傷時の上昇のどのように区別するかの議論が必要である。

その他のマーカーとして、NSE (neuron specific enolase) やGFAP (glial fibrillary acidic protein) が小児外傷の転帰を予期し得るマーカーとして<sup>20)</sup>、MAP (Microtubule-associated proteins)-2 の変化が脳損傷6ヶ月後の状態と相関することが報告<sup>21)</sup>されていた。

一方、非臨床ではカイニン酸モデル<sup>22)</sup> や外傷モデル<sup>23)</sup> を用いた際、マーカーが変動することが報告されているものの、臨床報告と比べて報告例は少なく、障害モデルの妥当性も精査する必要がある。

今回実施した検索式では、外傷時のマーカー変動の知見が多かった。例えば、臨床上課題になっている抗がん剤投与後の末梢性神経障害については、ほとんどヒットしてこなかった。今後、神経障害の調査において網羅性を向上させるには、種々検索式を変えていく必要がある。

### 今後の展望と課題

本研究班では、過去3年間に心臓・筋肉・神経に関する毒性バイオマーカーの調査を実施した。その結果、各臓器共に複数のマーカーが挙げられたが、特性の比較はできなかった。

今後、感度・特異性・再現性等、バイオマーカーに必要な特性を項目別に挙げ、それぞれのマーカーが合致するかを確認し、どのマーカーがより理想的であるかを比較検討していく必要がある。

新規毒性バイオマーカーの開発は、創薬を行う際、より早く経済的に候補物質の安全性を予測し、意思決定に必要な検体必要量の削減と迅速化を図る上で非常に重要である。FDAでは、バイオマーカーを網羅的に同定する試みが行われている。日本においても、トキシコゲノミクス・(インフォマティクス) プロジェクトのような試みが行われてきた。今後も産・官・学が協働して新規バイオマーカー開発を推進していく必要がある。

### 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) Tonomura T. et al.: Biomarker panel of cardiac and skeletal muscle troponins, fatty acid binding protein 3 and myosin light chain 3 for the accurate diagnosis of cardiotoxicity and musculoskeletal toxicity in rats. *Toxicology*, 302: 179-189 (2012)
- 3) Bradham W.S. et al.: High-sensitivity cardiac troponin-I is elevated in patients with rheumatoid arthritis, independent of cardiovascular risk factors and inflammation. *PLoS ONE*, 7(6): e38930 (2012)
- 4) Yokoi T. and Nakajima M.: Toxicological

- implications of modulation of gene expression by microRNA. *Toxicol. Sci.*, 123(1): 1-14 (2011)
- 5) Kukreja R.C. et al.: MicroRNAs: New players in cardiac injury and protection. *Mol.Pharmacol.*, 80: 558-564 (2011)
  - 6) Li C. et al.: Circulating microRNAs as novel and sensitive biomarkers of acute myocardial infarction. *Clin. Biochem.*, 45: 727-732 (2012)
  - 7) 野澤 巖: RNAi関連医薬品の開発動向. *PHARM STAGE*, 12(3): 3-7 (2012)
  - 8) 新飯田 俊平: 加齢性疾患へのmicroRNA標的薬の可能性. *日本臨床*, 70 (増刊8): 383-387 (2012)
  - 9) Sun D. et al.: Electrochemiluminescent immunoassay for rat skeletal troponin I (Tnni2) in serum. *J.Pharmacol.Toxicol.Method*, 61: 52-58 (2010)
  - 10) Egea-Gueereto J.J. et al.: Accuracy of the S100 $\beta$  protein as a marker of brain damage in traumatic brain injury. *Brain Injury*, 26(1): 76-82 (2012)
  - 11) Metting Z. et al.: GFAP and S100B in the acute phase of mild traumatic brain injury. *Neurology*, 78: 1428-1433 (2012)
  - 12) Mikkonen K. et al.: S100B proteins in febrile seizures. *Seizure*, 21: 144-146(2012).
  - 13) Lange R.T. et al.: Clinical utility of the protein S100B to evaluate traumatic brain injury in the presence of acute alcohol intoxication. *J. Head. Trauma Rehabil.*, 27(2): 123-134 (2012)
  - 14) Chabok S.Y. et al.: Neuron-specific enolase and S100BB as outcome predictors in severe diffuse axonal injury. *J. Trauma Acute Care Surg.*, 72(6): 1654-1657 (2012)
  - 15) Stein D.M. et al.: Use of serum biomarkers to predict cerebral hypoxia after severe traumatic brain injury. *J. Neurotrauma*, 29: 1140-1149 (2012)
  - 16) Tavaréz M.M. et al.: Acute evaluation of pediatric patients with minor traumatic brain injury. *Current opinion in pediatrics*, 24(3): 307-313 (2012)
  - 17) Seco M. et al.: Serum biomarkers of neurologic injury in cardiac operations. *Ann. Thorac. Surg.*, 94: 1026-1033 (2012)
  - 18) Michetti F. et al.: The S100B protein in biological fluids: more than a lifelong biomarker of brain distress. *J. Neurochem.*, 120: 644-659 (2012)
  - 19) Hocaoglu N. et al.: Is serum S100B protein a biomarker for amitriptyline-induced cardiovascular toxic effects? *Cardiovasc. Toxicol.*, 12(2): 115-122 (2012)
  - 20) Zurek J. and Fedora M.: The usefulness of S100B, NSE, GFAP, NF-H, secretagogin and Hsp70 as a predictive biomarker of outcome in children with traumatic brain injury. *Acta.Neurochir.*, 154: 93-103 (2012)
  - 21) Mondello S. et al.: Increased levels of serum MAP-2 at 6-month correlate with improved outcome in survivors of severe traumatic brain injury. *Brain Injury*, 26(13-14): 1629-1635 (2012)
  - 22) Glushakova O.Y. et al.: Cerebrospinal fluid protein biomarker panel for assessment of neurotoxicity induced by kainic acid in rats. *Toxicol. Sci.*, 130(1): 158-167(2012)
  - 23) Wu J.C. et al.: Location and level of Etk expression in neurons are associated with severity of traumatic brain injury. *PLoS One*, 7(6): e39226 (2012)
- 課題2 : 肝臓毒性、肺炎・血管炎、精巣毒性
- 調査担当者**
- 田口和彦、本山径子、荻野大和、下元貴澄、戸和秀一、韓 大健、友廣雅之、佐々木正治、小林章男、鈴木 睦 (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**
- B-1. 肝臓毒性、肺炎・血管炎、精巣毒性
- 今年度は、前年度の継続調査として、2012年度に公開された総説及び論文を中心に検索し、前年度分と照らし合わせ、新規性がある箇所を詳細に調査した。
- 肝臓毒性についてはPubMedを利用し、肺炎・血管

炎についてはEmbase及びPubMedを利用し、2012年に公表された総説及び論文を調査して新規バイオマーカー情報を収集した。

精巣毒性については、2011年度の調査の結果、病理組織変化に伴って変動する精巣特異的なmiRNAが報告され<sup>1)</sup>、miRNAが新規性の高い精巣毒性のバイオマーカーとなる可能性が期待された。したがって、本年度は精巣特異的に発現変動を示す尿・血液中miRNAに着目して継続調査し、並びに近年著しい進展をみせているイメージング手法による評価系を新たに調査項目に加え、Embase及びPubMedを利用して情報の収集を行った。

## B-2. 骨毒性、消化管毒性

主なデータベースとして、骨毒性はEmbase及びPubMedを、消化管毒性はPubMed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った。また、必要に応じて引用文献等を参照した。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

尿中あるいは血中バイオマーカーは、臨床試験に容易に組み入れることができ、非臨床でのリスク評価結果を臨床に外挿することができる。現状では、重要な毒性の発現と関連する、適切な新規の予測的血液中バイオマーカーはほとんどない。例えば、血管炎、肺毒性（間質性肺炎など）、特異体質性肝障害、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、有用性が立証された血中バイオマーカーは存在しない<sup>2)</sup>。規制当局は、革新的で安全な薬剤の開発を成功させるため、毒性を早期から臨床的に検出できる、感度が高く予見性の優れた試験法の利用を推奨している。

骨障害を評価できるバイオマーカーは、他の障害のバイオマーカーよりも比較的多く報告され、いく

つかのマーカーは臨床・非臨床共通で使われている。一方、骨組織は、個体の成長に伴う長骨の伸長、骨形成・骨吸収によって常に動的状態にあり、バイオマーカーの背景値が動物の年齢や動物種による骨生理や生化学の違いによって大きく異なる。また、動物種による骨生化学の違い、バイオマーカーの測定原理や測定感度に起因して、動物種によっては利用できないバイオマーカーもある。

臨床における消化管毒性（副作用）は、基質的な粘膜傷害、嘔吐や下痢などの目に見える症状、胸焼け・胃部不快感・腹痛など、患者からの訴えによるものなど多岐にわたる<sup>3) 4)</sup>。これらの消化管毒性は、投薬中止により容易に回復するケースが多く、また重篤になる前に捕えられるケースが多いことから、バイオマーカーの必要性は薄いかもかもしれない。その一方では、がん患者において化学療法・放射線療法などによって惹起される粘膜炎（粘膜傷害）が問題となっている<sup>3)</sup>。化学療法による粘膜炎は小腸での発現が顕著であるが、直接小腸を検査・評価するのが難しいため、粘膜炎をより詳細に把握（薬物投与量の加減に重要）するためのツールが必要とされており、いくつかの機能検査法が開発されている<sup>5)</sup>。さらに、粘膜傷害に特異的な血中バイオマーカーの探索も試みられている<sup>6)</sup>。

非臨床試験においては、抗がん剤または一般的な化合物投与による消化管毒性は嘔吐や下痢を伴うことが多いが、粘膜傷害は病理組織検査で初めて検出される場合もある。そのような場合は、病理組織検査よりも鋭敏に消化管毒性を検出できるバイオマーカーも有用であろう。ただし、現状では消化管毒性に特異的な血中・尿中マーカーはほとんど利用されていない。

### C-2. 肝臓毒性のバイオマーカー

#### C-2-1. 血中リン脂質類（リゾホスファチジルコリン等）

ガラクトサミン誘発肝障害ラットの血清を用いてメタボロミクス解析したところ、数種類のリン脂質類に明らかな変動が認められている<sup>7)</sup>。これらのメタボロミクス解析には、高性能分析装置

(UPLC-MS/MS) による物質同定と多変量解析法を組み合わせたマーカー探索手法が用いられている。しかし、血中ALT活性も10倍以上の上昇がみられる条件での検索であり、感受性・特異性は十分に解析されていない。また、ヒトへの外挿性も考察されていないことから、有用性については、更なる報告が待たれる。

#### C-2-2. GSH関連アミノ酸（ピルビン酸、クレアチニン、クレアチン、システイン等）

臨床におけるアセトアミノフェン肝障害のリスク因子の一つとして栄養状態が知られている。ラットを用いたアセトアミノフェン慢性肝障害モデルにおいて、動物の栄養状態の変化に伴いGSH関連アミノ酸あるいは窒素化合物の尿中排泄量や血中濃度が変化していたことから、アセトアミノフェン肝障害を予測できるマーカーになる可能性がある<sup>8)</sup>。また、臨床においては、これらの項目を用いて高感受性者を選別する因子として報告されており、有益なバイオマーカーの可能性が考えられる<sup>9)</sup>。

#### C-2-3. Proteomics

二次元電気泳動・等電点電気泳動（定量性と再現性）と、LC-MS/MS（MALDI法・ESI法）を利用したショットガンプロテオミクス（網羅性）を組み合わせ、得られたデータをアルゴリズムによりたんぱく質あるいはDNAデータベースと照合・同定して有益な蛋白変動を見つける手法である<sup>10)</sup>。ここでは個々の蛋白の動きではなく、パネル等を利用した総合的な蛋白変動をもとに判断して肝毒性を検出する。

#### C-2-4. 血中miRNA122

各種薬剤誘発性のラットモデルを使用し、既存のマーカーとmiRNA（マイクロRNA）について比較した結果<sup>11)</sup>、アシルアルコール投与による門脈周囲肝細胞壊死では、miRNA122に加え、ALT、AST等全てのバイオマーカーが変動した。小葉中心性の肝細胞障害を起こすアセトアミノフェンや胆汁うっ滞型のANITを投与したモデルでは、投与後6hrの早期から血中miRNAと $\alpha$ -GSTが上昇した。また、肝肥大を起

こすフェノバルビタールや肝細胞障害性ではないドキシソルビシン投与のモデルでは早期に血中miRNAが一時的に上昇した。いずれの薬剤誘発性モデルにも反応し、特に早期から検出可能である血中miRNA122は有用なバイオマーカーとなる可能性がある。

### E. 結論（肝臓毒性）

肝臓毒性のバイオマーカーについては2012年分のアップデートであったことから、大きな進展は認められていないが、昨年に引続きmiRNAの報告が多くなっている。miRNAはヒトへの外挿性という点で優れているため、報告数が多くなる傾向がみられる。しかし、近年血中や尿中での安定性に問題があるとの報告もあることから、これらの報告の中で安定性などについて注意する必要がある<sup>12)</sup>。また、miRNAの安定性の問題が明らかになることで、これまでと異なる結果が報告される場合も想定する必要がある。

#### C-3. 肺炎のバイオマーカー

##### C-3-1. 血中8-oxodeoxyguanosine (8-OHDG)

DNAを構成する塩基の一つdeoxyguanosine (dG)の8位がヒドロキシル化された構造を持つDNA酸化損傷マーカーである。現在最も広く用いられている酸化ストレスマーカーの一つで、動物種を問わず尿で測定できるほか、血清、末梢白血球、臓器組織など多様な試料で測定可能である。ELISAにより測定する（市販キット有）。マウスを用いたタバコ煙とCOPDの関連を検討した吸入実験<sup>13)</sup>で、肺病変の早期診断マーカーとして利用されている。肺気腫様病変の発生に伴って血漿中8-OHDGが有意に上昇し、病変との関連性が認められた。酸化ストレスのマーカーであるため、特異性や感度について臨床及び非臨床試験で更なる検討が必要である。

##### C-3-2. D-dimers

フィブリンの溶解産物であるD-dimersは、市中肺炎（CAP）の重症度スコアリングであるPSI及びCURB-65と良好な相関を示し、30日死亡率や人工呼吸器の必要性の予測に利用される。プロスペクティ

ブ試験では血清中濃度2000 ng/mL以上で死亡率が有意に高く、500 ng/mL未満では死亡及び人口呼吸器が必要となるリスクが低い。よって、死亡のリスクが低く、外来患者として管理できるCAP患者を特定するための有用なマーカーとなる可能性がある<sup>14, 15)</sup>。非臨床では、マウスを用いた敗血症に対する recombinant human activated protein Cの改善効果に関する実験<sup>16)</sup>、肺炎におけるプラスミノゲン活性化因子への影響を調べる実験<sup>17)</sup>で、線維素溶解の指標として利用されている。

#### C-3-3. B型ナトリウム利尿ペプチド (BNP)

BNPは炎症性サイトカインの産生や交換神経の活性化など、いくつかの要因がトリガーとなって産生されるため、肺炎の重症度を反映すると考えられ、市中肺炎 (CAP) の重症度の指標としての使用に関心が高まっている。小規模の試験 (58例) において、BNPの予測性は重症度分類PSI (Pneumonia Severity Index) よりも高いことが示唆された。BNPを含め、CAP患者の死亡率を予測する数種のマーカーを評価した試験では、BNPは生存者よりも非生存者で有意に高かった。また、BNPはPSIと良好な相関を示し、PSI単独の予測性の精度を有意に改善した<sup>14, 15)</sup>。非臨床試験での利用報告は見つからなかった。

#### C-3-4. アドレノメデュリン (ADM)

血管拡張作用を有する内在性ペプチドで、速やかに循環から除去されるため血清での測定は困難であるが、ADMと同じ前駆ペプチドから生成される生理活性ペプチドの pro adrenomedullin (pro-ADM) は、ADMレベルを反映する。市中肺炎 (院外肺炎、CAP) のコホート研究 (n=1653) では、pro-ADMはPSIと早期死亡率と相関し、肺炎の重症度マーカーとなることが示唆された。また、PCT、copeptinなどのバイオマーカー及びPSI、CURB-45などの重症度スコアよりも重篤な合併症を識別できた<sup>14, 15)</sup>。非臨床試験での利用報告は見つからなかった。

#### C-4. 血管炎のバイオマーカー

##### C-4-1. 血中内皮細胞活性化マーカー

ヒトにおけるANCA関連血管炎と実験動物の薬物性血管障害との間には、①免疫病理学的機序 (内皮細胞の活性化)、②形態変化 (血管壁のフィブリノイド壊死、好中球浸潤)、③好発部位 (小動脈、細動脈、毛細血管、小静脈)、④内皮細胞由来血管マーカーの上昇、の点から類似性がみられる。ANCA関連血管炎と動物の薬物性血管障害で共通する可溶マーカーとしてCRP、IL-6、IL-8、IL-1ra、 $\alpha_2$ -マクログロブリン、トロンボモジュリン、vWF (von Willebrand因子)、MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1)、ICAM-1、tPA (tissue plasminogen activator) などのほか、細胞成分マーカーとして循環血中内皮細胞や内皮細胞由来微小粒子が報告されている<sup>18)</sup>。これらはいずれもバイオマーカー候補として利用できる可能性があるが、特異性や感度について臨床及び非臨床試験で更なる検討が必要である。

#### E. 結論 (肺炎・血管炎のバイオマーカー)

肺炎に関して、昨年までの報告にない新規マーカーは、市中肺炎に関するものであった。市中肺炎の一番の懸念事項は死亡であり、市中肺炎の重篤度を予測するマーカーが必要とされている。昨年報告したCRP、プロカルシトニン、コルチゾル、コペプチン及びMR-pro-ANPもこの重篤度を予測するマーカーになるが、それに加えて最近注目されているマーカーとして、D-dimers、BNP及びADMが2012年に報告された。市中肺炎の重篤度の評価として、PSIやCURB-65などの重症度スコアリングがあるが、これらとの相関に基づいてマーカーとしての使用可能性が臨床で検討されている。D-dimersはフィブリンの溶解産物であることから肺炎や敗血症での基礎研究で線維素溶解の指標としての使用がみられるが、D-dimers、BNP、ADMのいずれも非臨床では肺炎のマーカーとしての使用は見当たらなかった。いずれのマーカーも利点と欠点があり、CAPの重症度スコアリングの代わりとして使用するというよりも、補足的なツールであり、現時点ではCAPの重篤度を評価するゴールドスタンダードとなるバイオマーカー

一はないと考えられている。

血管炎に関しては、昨年報告したCRP、プロカルシトニン及びPTX3が2012年にも報告されているが、新規のものは見当たらなかった。

炎症のバイオマーカーに関しては、2012年も既知のマーカーを検証する報告はみられたが、バイオマーカーとしての適格性が確認できた新規の毒性・副作用マーカーの報告は見つからず、炎症領域においては信頼性のあるバイオマーカーの探索の困難さがうかがわれた。

#### C-5. 精巣毒性のバイオマーカー

Embaseで検索した結果、精巣のバイオマーカーに関する総説が14件ヒットしたが、精巣毒性の尿中あるいは血中miRNAに関する論文及びイメージングに関する論文の報告はなかった。また、PubMedで検索した結果、精巣に関するmiRNAの総説が50件ヒットしたが、精巣特異的に発現変動を示す尿中あるいは血液中miRNAに関する論文報告はなかった。

### E. 結論（精巣毒性のバイオマーカー）

昨年度は、精巣毒性の検出感度が病理組織学的検査ほど鋭敏ではないものの、従来から測定が行われているホルモン濃度（Testosterone、LH、FSH、Inhibin Bなど）や、精巣障害に起因するCreatine、血液精巣関門破綻による漏出精細管蛋白質（FABP9、VASA）、精子中の酸化ストレスに関連したマーカーや精子中SP22が、非侵襲性のマーカーとして有用となる可能性を報告した。また、精巣毒性物質投与後に精巣特異的なmiRNA（92a、134、188-5p、320、449a）が病理組織学的変化に伴って変動することを報告し<sup>1)</sup>、miRNAが特異性の高い精巣毒性の新規バイオマーカーとなる可能性を示した。しかしながら、継続調査した結果、本年度においては精巣に関する尿中あるいは血液中miRNAの知見は報告されておらず、バイオマーカーとしてのmiRNAの利用については今後も研究動向を調査する必要があると考えられた。また、本年度は新たにイメージング手法に関して文献調査を行ったが、新たな論文報告はなく、病理組織学的検査に代わる鋭敏な評価系の報告はなされて

いなかった。

#### C-6. 骨毒性のバイオマーカー

##### C-6-1. オステオカルシン（OC）

OCは成熟骨芽細胞より産生される49個のアミノ酸からなる骨基質蛋白である。骨と歯牙にのみ分布しており、骨疾患において骨の代謝回転状態を把握する指標とされている<sup>19)</sup>。総じて、血清中のOCと骨形成速度の間に密接な関係が示されており、他の骨形成のマーカーとの間にも相関が認められている<sup>20)</sup>。測定にあたっては、ヒト用のRIA及びELISAキットが市販されており、いくつかの動物種での交差性も確認されている。また、ラット、マウス、イヌのOCを測定するキットも入手できる<sup>20)</sup>。デキサメタゾンを投与したラットにおいて、骨量が減少するとともに、血漿中のOCが減少することが報告されている<sup>21)</sup>。また、主に閉経後のヒト女性において、骨密度と相関を示すことが報告されている<sup>22)</sup>。

##### C-6-2. 骨型アルカリフォスファターゼ（BAP）

骨組織（骨芽細胞）に特異的に存在するアルカリフォスファターゼである。BAPの血中濃度は骨芽細胞からの放出速度と肝臓でのクリアランス率の両者に依存し、その結果、骨芽細胞の機能が亢進し、骨形成活性が亢進している時期には血中BAPは上昇する<sup>23)</sup>。測定にあたっては、ヒト用のRIA及びELISAキットが市販されており、いくつかの動物種での交差性も確認されている<sup>20)</sup>。卵巣摘出ラット<sup>24)</sup>、精巣摘出ラット<sup>25)</sup>、卵巣摘出サル<sup>26)</sup>などのモデル動物では、血清中BAPが上昇することが認められている。また、主に閉経後のヒト女性において、骨密度と相関を示すことが報告されている<sup>22)</sup>。

##### C-6-3. I型プロコラーゲン-N-プロペプチド（PINP）

骨基質蛋白の主要成分のI型コラーゲンが骨芽細胞において生成される際に、その前駆体であるI型プロコラーゲンのN末端より切断されて、血中に放出されたペプチドがPINPである。ヒトにおいては、PINPの日内変動は小さく、食事の影響を受けにくい

ことが報告されている<sup>27)</sup>。測定にあたっては、ヒト用のRIA及びELISAキットが市販されており、いくつかの動物種では交差性も確認されている<sup>20)</sup>。卵巣摘出ラット<sup>28, 29)</sup>及びサル<sup>26)</sup>において、血清中のPINPが増加することが報告されている。一方、ダイオキシンの短期曝露を受けたラットにおいては、骨量が低下するとともに血清中のPINPが減少することが報告されている<sup>30)</sup>。

#### C-6-4. ピリジノリン (PYD)

PYDは骨、軟骨、象牙質、靭帯、腱、関節などのコラーゲンに存在し、成熟されたコラーゲンの崩壊に伴い放出され、骨吸収に特異的なマーカーと考えられている。特異性としては、骨や歯牙にしか存在しないデオキシピリジノリンがより骨に特異性が高いと考えられる<sup>19)</sup>。測定にあたっては、ヒト用のELISA測定キットが市販されており、広範な動物種での交差性が確認されている。PYDは食餌の影響は受けないが、腎機能に影響される<sup>20)</sup>。卵巣摘出ラットにおいて、PYDが上昇することが認められている<sup>31)</sup>。また、ラット血清中のPYDがニコチン投与により上昇し<sup>32)</sup>、デキサメタゾンの投与により減少する<sup>21)</sup>ことが報告されている。

#### C-6-5. デオキシピリジノリン (DPD)

DPDは、主要骨基質タンパク質であるI型コラーゲンの分子間に架橋を形成するピリジニウム架橋アミノ酸のひとつである。DPDは軟骨には存在しないので骨への特異性が高い。夜間に骨代謝が亢進するので、尿中DPD排泄量には日内変動がみられる。ヒトでは、骨吸収が亢進する疾患（骨粗鬆症・悪性腫瘍の骨転移など）の経過観察に利用されている。尿中DPD排泄量は糖尿病モデルラット<sup>33)</sup>、卵巣摘出モデルマウス<sup>34)</sup>で増加することが、アレンドロネート投与イヌ<sup>35)</sup>、イバンドロネート投与サル<sup>36)</sup>、オステオプロテジェリン投与サル<sup>37)</sup>で減少することが報告されている。

#### C-6-6. I型コラーゲン架橋N-テロペプチド (NTX)

NTXは主要骨基質タンパク質であるI型コラー

ゲンの分解産物である。I型コラーゲンの架橋構造は成熟コラーゲン線維にのみ存在するので、NTXは骨吸収の有用なマーカーとなる。夜間に骨代謝が亢進するので、NTXには日内変動がみられる。ヒトでは、骨吸収が亢進する疾患（骨粗鬆症・悪性腫瘍の骨転移など）の経過観察に利用されている。骨肉腫イヌ<sup>38)</sup>、非腫瘍性骨分解イヌ<sup>39)</sup>で血清NTXが増加することが、糖尿病モデルラット<sup>33)</sup>、脊髄性骨萎縮症モデルマウス<sup>40)</sup>、骨肉腫イヌ<sup>39)</sup>で尿NTXが増加することが報告されている。また、ゾレドロネート投与マウス<sup>41)</sup>、カテプシンK阻害剤投与サル<sup>42)</sup>で血清NTXが減少することが、ゾレドロネート投与イヌ<sup>43)</sup>、イバンドロネート投与サル<sup>36)</sup>、カテプシンK阻害剤投与サル<sup>42)</sup>、オステオプロテジェリン投与サル<sup>37)</sup>で尿NTXが減少することが報告されている。

#### C-6-7. I型コラーゲン架橋C-テロペプチド (CTX)

CTXは主要骨基質タンパク質であるI型コラーゲンの分解産物である。I型コラーゲンの架橋構造は成熟コラーゲン線維にのみ存在するので、CTXは骨吸収の有用なマーカーとなる。夜間に骨代謝が亢進するので、CTXには日内変動があり、NTXのそれよりも大きいと言われている。ヒトでは、骨吸収が亢進する疾患（骨粗鬆症・悪性腫瘍の骨転移など）の経過観察に利用されている。卵巣摘出モデルラット<sup>44)</sup>、骨粗鬆症モデルラット<sup>45)</sup>、骨肉腫イヌ<sup>38)</sup>でCTXが増加することが、アレンドロネート投与ラット<sup>46)</sup>、ゾレドロネート投与イヌ<sup>43)</sup>、カテプシンK阻害剤投与サル<sup>42)</sup>でCTXが減少することが報告されている。

#### C-6-8. 酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ-5b (TRACP-5b)

TRACPは骨代謝に関連する酵素で、そのアイソフォームであるTRACP-5bは、破骨細胞に局在する。他の多くのマーカーが分解産物を測っているのに対し、TRACP-5bは破骨細胞機能を直接観察する。腎機能や日内変動の影響を受けにくい、動物の報告はまだ少ない。ヒトでは、骨吸収が亢進する疾患（骨粗鬆症・悪性腫瘍の骨転移など）の経過観察に利用されている。動物においては、脊髄性筋萎縮症モデ

ルマウス<sup>40)</sup>でTRACP-5bが増加することが、関節炎モデルラット<sup>47)</sup>でTRACP-5bが減少することが報告されている。

#### C-6-9. オステオポンチン (OPN)

分泌型リンタンパク質であるOPNは、骨芽細胞及び破骨細胞が産生する主要な非コラーゲン性の骨組織マトリックスの1つである。OPNは骨強度及び骨リモデリングと関連性があり、骨ホメオスタシスに重要な役割を果たしていると考えられている。閉経群の血漿中OPNは対照(妊娠可能年齢女性)群と比較して高値を示した<sup>48)</sup>。OPNが欠損し、さらに構造的活性型PTHレセプターを発現したマウスは、構造的活性型PTHレセプターのみ発現したマウスと比較して、血清ALP、血清オステオカルシン及び尿中デオキシピリジノリンの有意な高値を示し、OPNはPTH作用の調節に重要な役割を果たしていると考えられている<sup>49)</sup>。

#### C-6-10. オステオプロテジェリン (OPG)

OPGは骨芽細胞によって産生され、骨芽細胞の膜上に発現する破骨細胞分化因子RANKLにデコイ受容体として直接結合し、破骨細胞の分化を阻害することで骨吸収を抑制する。骨シアロタンパク質(BSP※)遺伝子を導入したマウスは骨吸収亢進状態を示し、対照群(野生型)と比較して血清中OPGの有意な低値を示した<sup>50)</sup>。(※BSPは、破骨細胞、骨芽細胞、骨細胞及び肥大軟骨細胞が産生する主要な非コラーゲン性の骨組織マトリックスタンパク質の1つであり、骨形成・骨吸収の過程に関与している。)閉経後女性群の血清中OPGは対照(妊娠可能女性)群と比較して有意に高値を示した<sup>51)</sup>。

#### C-6-11. 破骨細胞分化因子RANKL

骨芽細胞の膜上に発現する破骨細胞分化因子RANKLは骨吸収促進作用を有する。骨シアロタンパク質(BSP)遺伝子を導入したマウスは骨吸収亢進状態を示し、対照群(野生型)と比較して血清中RANKLの有意な高値を示した<sup>50)</sup>。また、閉経後女性

群の血清中RANKLは対照(妊娠可能女性)群と比較して有意に低値を示した<sup>51)</sup>。

#### C-6-12. miRNA-133a

miR-133aは、骨芽細胞と軟骨細胞の分化に関与する転写因子であるRunx2をターゲットとしてその発現を調節することで骨芽細胞発生を調節するとされている。低骨密度の閉経後女性は、高骨密度の閉経後女性と比較してmiR-133a発現レベルの有意な高値を示した<sup>52)</sup>。

### E. 結論(骨毒性バイオマーカー)

上述の通り、臨床・非臨床を問わず、骨障害に関する種々のバイオマーカーが盛んに利用されていた。また、臨床及び非臨床において、骨代謝マーカーを含む各種測定項目が記載されている骨粗鬆症ガイドラインが存在し、これらは、様々な骨疾患で適切な骨バイオマーカーを選択するうえで有用な情報源となる。今後も様々な骨バイオマーカー候補が取り上げられると思われるが、それらを採用するには、以下の点を考慮すべきである。

- 骨障害時に骨形成/骨吸収のバランスが崩れたとしても、骨形成または骨吸収の一方向のみに傾くことは考えにくく(増殖性変化除く)、骨形成または骨吸収が絶えず繰り返されていることを考慮した上で、骨バイオマーカーのデータを評価すべきである。
- ターゲットとなる骨疾患が全身性か局所性かを理解し、選択された測定項目の感度が十分であることを確認するべきである。
- 選択した測定項目の同種動物間におけるばらつきや年齢による変動を想定し、経時的評価などについて事前に検討すべきである。

今回、骨障害を評価できるバイオマーカーまたはその候補に関する情報をいくつか収集することができた。それらバイオマーカーを安全性評価の指標として利用するためには、さらなる調査や検討によって、精度や再現性が十分に保証されていることを確認する必要があると考えられた。

## C-7. 消化管毒性のバイオマーカー

### C-7-1. 消化管粘膜透過性・吸収性機能を指標とする検査

#### 1) 粘膜透過性を指標とする検査

糖透過性：主に化学療法・放射線療法などを施されたがん患者に対して用いられている。膜透過の性質が異なる2種の糖 (disaccharide/monosaccharid) を利用し、尿中または血中における存在比を調べる<sup>5, 53)</sup>。小腸粘膜における表面積の減少により粘膜上皮細胞内を透過する単糖 (L-rhamnose、mannitolなど) の尿中排泄は減少し、粘膜上皮tight junctionからの漏出により二糖類 (lactulose、sucroseなど) の尿中排泄は増加する<sup>53)</sup>。

EDTA透過性：<sup>51</sup>Cr-EDTA (プラズマ発光分析による非ラベル体の測定も可能) を経口投与し、尿に排泄される量を測定して、消化管粘膜透過性を調べる<sup>5, 53-56)</sup>。<sup>51</sup>Cr-EDTAの尿中排泄量が増加した場合に、透過性増加 (= 粘膜傷害) と判断される。EDTAは小腸内で分解されないことから、大腸粘膜透過性を調べることもできる。

その他：Iohexol (造影剤)<sup>57)</sup>、Polyethylene glycol (PEG) polymers<sup>3)</sup>、Polyvinylpyrrolidone (PVP)<sup>3)</sup>なども粘膜透過性評価に用いられる。このような粘膜透過性試験は、臨床だけではなく非臨床においてもラット<sup>54-56)</sup>、イヌ<sup>57)</sup>において報告されている。

#### 2) 呼気中マーカーを利用する試験

水素：経口摂取した種々糖が小腸の機能不全による吸収不良に伴い結腸に到達すると、結腸内細菌により水素ガスが発生する。呼気中水素の増加は、消化機能の低下を示唆する<sup>5, 53)</sup>。

エタン：消化管炎症の一因は、活性酸素種 (ROS) を介した脂質過酸化である。脂質過酸化によって発生するアルカン (エタン) の呼気中濃度は消化管炎症の指標となる<sup>3)</sup>。

oro-cecal transit time (OCTT、口盲腸通過時間)：経口摂取されたlactulose (fructose + galactose) は小腸では分解されず、結腸内細菌叢により分解され水素を発生する。経口摂取から呼気中水素発生までの時間を指標に、消化管輸送機能が評価できる<sup>5, 53)</sup>。

<sup>13</sup>C-sucrose breath test (SBT)：経口摂取された<sup>13</sup>C-sucroseは小腸で<sup>13</sup>C-glucose + <sup>13</sup>C-fructoseとして吸収され、肝臓で<sup>13</sup>CO<sub>2</sub>に代謝、肺を経て呼気中に排出される。経口摂取後一定時間の呼気中<sup>13</sup>CO<sub>2</sub>を測定することで小腸での糖質吸収機能を評価する<sup>5, 53)</sup>。

#### 3) その他

Vitamin A：経口摂取させ、血中濃度を測定することにより消化管吸収能を評価する手法が報告されている<sup>3, 58, 59)</sup>。

### C-2-2. 血中マーカー

シトルリン (Citrulline)：シトルリンは主に小腸上皮細胞にて代謝・産生されるアミノ酸である。血中シトルリンは小腸由来であり、その血中濃度は小腸細胞数と相関する。血中シトルリンの減少は、小腸細胞数及び小腸機能の減少を示唆する<sup>54)</sup>。

### C-2-3. 糞中マーカー

下痢及び便秘：最も簡易かつ有用なバイオマーカーである<sup>5)</sup>。

便潜血検査：汎用されており、ヒトでは抗ヒトHb抗体を用いる免疫学的方法が主流である。ただし、非臨床試験で使用する場合は種特異性の問題から交差性に注意すべきである。動物でも利用可能な (ヘモグロビンのペルオキシダーゼ様活性を利用する) グアヤック法検査試薬として、Stool Blood Test Kits (Cenogenics Co.) がある<sup>60)</sup>。

腸内細菌叢：イリノテカン投与ラットの実験から、腸内細菌叢の変化と下痢あるいは粘膜炎との関連性が指摘されている<sup>3, 61)</sup>。

### C-2-4. 組織中マーカー

ADMA (asymmetric dimethylarginine、非対称性ジメチルアルギニン)：ADMAは、胃粘膜保護作用のある一酸化窒素 (NO) 産生を阻害し、粘膜傷害を惹起するといわれている<sup>62, 63)</sup>。また、炎症性サイトカイン産生の誘発作用も示唆されている<sup>62)</sup>。エタノール (+ニコチン) 誘発胃粘膜傷害ラットの胃液中でのADMA増加<sup>63)</sup>、H.ピロリ感染患者での組織中

ADMA増加<sup>62)</sup>、Cold stressやIndomethacinによる組織中ADMA増加<sup>62)</sup>などが報告されており、組織中ADMA量は粘膜傷害を検出するバイオマーカーとして検討されている。

#### E. 結論（消化管毒性のバイオマーカー）

消化管毒性のバイオマーカーとしては、臨床で消化管機能検査に使用されているマーカーが主に報告されていた。粘膜傷害を検出するための非侵襲的な血中マーカー等も探索されているものの、鋭敏かつ正確に傷害が検出可能と考えられるマーカーは臨床・非臨床ともに今回の調査では見当たらなかった。

#### G. 参考文献

- 1) Fukushima T. et al.: MicroRNAs expression in the ethylene glycol monomethyl ether-induced testicular lesion. *J. Toxicol. Sci.*, 36: 601-611 (2011)
- 2) Tarrant M.: Blood cytokines as biomarkers of in vivo toxicity in preclinical safety assessment: Considerations for their use. *Toxicol. Sci.*, 117: 4-16 (2010)
- 3) Melichar, B and Zedulová, M.: The significance of altered gastrointestinal permeability in cancer patients. *Curr. Opin. Support. Palliat. Care.*, 5: 47-54 (2011)
- 4) 樋口勝彦 他：日本臨床, 65, Suppl 8, 126-130, 497-525 (2007)
- 5) Butler, R.N.: Measuring tools for gastrointestinal toxicity. *Curr. Opin. Support. Palliat. Care.*, 2: 35-39 (2008)
- 6) Crenn, P. et al.: Citrulline as a biomarker of intestinal failure due to enterocyte mass reduction. *Clin. Nutr.*, 7: 328-339 (2008)
- 7) Gonzalez et al.: Serum UPLC-MS/MS metabolic profiling in an experimental model for acute-liver injury reveals potential biomarkers for hepatotoxicity. *Metabolomics.*, 8: 997-1011(2012)
- 8) Kondo et al.: Enhancement of acetaminophen-induced chronic hepatotoxicity in restricted fed rats: A nonclinical approach to acetaminophen-induced chronic hepatotoxicity in susceptible patients., *J. Toxicol. Sci.*, 37, 5, 911-929 (2012)
- 9) Winnike JH et al.: Use of pharmaco-metabonomics for early prediction of acetaminophen-induced hepatotoxicity in humans., *Clinical pharmacology & Therapeutics.*, 88, 1, 45-91 (2010)
- 10) Van Summeren A et al.: Proteomics in the search for mechanisms and biomarkers of drug-induced hepatotoxicity., 26, 3, 373-385 (2012)
- 11) Verheyen G.R et al.: Evaluation of miRNA and Other Biomarker in Distinct Acute Liver Injury in Rats., *Toxicologic Letters.*, 205 SUPPL. 1 (2011)
- 12) Yamaura et al.: Plasma MicroRNA Profiles in Rat Models of Hepatocellular Injury, Cholestasis, and Steatosis., *PLoS ONE.* volume 7 (2012)
- 13) Wang C.-K. et al.: Enhancement between environmental tobacco smoke and arsenic on emphysema-like lesions in mice. *J. Hazard. Mater.*, 221-222, 256-263 (2012)
- 14) Pereira J.M. et al.: Assessing severity of patients with community-acquired pneumonia. *Semin. Respir. Crit. Care. Med.* 33, 272-283 (2012)
- 15) Pereira J.M. et al.: Severe sepsis in community-acquired pneumonia – Early recognition and treatment. *Eur. J. Intern. Med.* 23, 412-419 (2012)
- 16) Schouten M. et al.: Recombinant activated protein C attenuates coagulopathy and inflammation when administered early in murine pneumococcal pneumonia. *Thromb. Haemost.* 106, 1189-1196 (2011)
- 17) Renckens R. et al.: Transgenic tissue-type plasminogen activator expression improves host defense during Klebsiella pneumonia. *J. Thromb. Haemost.* 6, 660-668 (2008)
- 18) Zhang J. et al.: Biomarkers of endothelial cell activation: Candidate markers for drug-induced vasculitis in patients or drug-induced vascular injury in animals. *Vasc. Pharmacol.*, 56, 14-25

- (2012)
- 19) 松本俊夫 編著: 新・分子骨代謝学と骨粗鬆症. メディカルレビュー社, 368-370 (2001)
  - 20) Allen MJ: Biochemical Markers of Bone Metabolism in Animals: Uses and Limitations. *Vet. Clin Pathol.*, 32: 101-113 (2003)
  - 21) Suhana E et al.: Effect of 11 $\beta$ -HSD1 dehydrogenase activity on bone histomorphometry of glucocorticoid-induced osteoporotic male Sprague-Dawley rats. *Singapore Med. J.*, 52:786-793 (2011)
  - 22) Biver E et al.: Bone turnover markers for osteoporotic status assessment? A systematic review of their diagnosis value at baseline in osteoporosis. *Joint Bone Spine*, 79: 20-25 (2012)
  - 23) 太田博明: 骨形成マーカー「骨型アルカリフォスファターゼ」測定の意義と測定法に関する新たな進展. *モダンメディア*, 58(5): 143-148 (2012)
  - 24) Miyazaki T et al.: Changes in Receptor Activator of Nuclear Factor-kappaB, and Its Ligand, Osteoprotegerin, Bone-type Alkaline Phosphatase, and Tartrate-Resistant Acid Phosphatase in Ovariectomized Rats. *J. Cell. Biochem.*, 93: 503-512 (2004)
  - 25) Gradosova I et al.: Protective effect of atorvastatin on bone tissue in orchidectomised male albino Wistar rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 679: 144-150 (2012)
  - 26) Masarachia PJ et al.: Odanacatib Reduces Bone Turnover and Increases Bone Mass in the Lumbar Spine of Skeletally Mature Ovariectomized Rhesus Monkeys. *J Bone Miner Res.*, 27: 509-523 (2012)
  - 27) Koivula M et al.: Measurement of aminoterminal propeptide of type I procollagen (PINP) in serum. *Clin. Biochem.*, 45: 920-927 (2012)
  - 28) Leeming DJ et al.: Enzyme-linked immunosorbent serum assays (ELISAs) for rat and human N-terminal pro-peptide of collagen type I (PINP) — Assessment of corresponding epitopes. *Clin. Biochem.*, 43: 1249-1256 (2010)
  - 29) Rissanen JP et al.: Short-Term Changes in Serum PINP Predict Long-Term Changes in Trabecular Bone in the Rat Ovariectomy Model. *Calcif. Tissue. Int.*, 82: 155-161 (2008)
  - 30) Lind PM et al.: Short-term exposure to dioxin impairs bone tissue in male rats. *Chemosphere*, 75: 680-684 (2009)
  - 31) Goss PE et al.: The selective estrogen receptor modulator SCH 57068 prevents bone loss, reduces serum cholesterol and blocks estrogen-induced uterine hypertrophy in ovariectomized rats. *J. Steroid Biochem Mol. Biol.*, 92: 79-87 (2004)
  - 32) Hapidin H et al.: Effects of Nicotine Administration and Nicotine Cessation on Bone Histomorphometry and Bone Biomarkers in Sprague-Dawley Male Rats. *Calcif. Tissue Int.*, 88: 41-47 (2011)
  - 33) Hie M et al.: Increased cathepsin K and tartrate-resistant acid phosphatase expression in bone of streptozotocin-induced diabetic rats. *Bone*, 41:1045-1050 (2007)
  - 34) Tanaka T et al.: Kudzu (*Pueraria lobata*) Vine Ethanol Extracts Improve Ovariectomy-Induced Bone Loss in Female Mice. *J. Agric. Food Chem.*, 59: 13230-13237 (2011)
  - 35) Allen MR et al.: Bisphosphonates alter trabecular bone collagen cross-linking and isomerization in beagle dog vertebra. *Osteoporos. Int.*, 19: 329-337 (2008)
  - 36) Smith SY et al.: Intermittent intravenous administration of the bisphosphonate ibandronate prevents bone loss and maintains bone strength and quality in ovariectomized cynomolgus monkeys. *Bone*, 32: 45-55 (2003)
  - 37) Smith BB et al.: A Toxicity Profile of Osteoprotegerin in the Cynomolgus Monkey. *Int. J. Toxicol.*, 22: 403-412 (2003)
  - 38) Lucas PW et al.: A Comparison of Five Different Bone Resorption Markers in Osteosarcoma-Bearing Dogs, Normal Dogs, and Dogs with Orthopedic Diseases. *J. Vet. Intern. Med.*, 22: 1008-1013 (2008)

- 39) Youkhanna D et al.: Bone Resorption Markers and Dual-Energy X-Ray Absorptiometry in Dogs with Avascular Necrosis, Degenerative Joint Disease, and Trauma of the Coxofemoral Joint. *Vet. Sur.*, 41: 551-558 (2012)
- 40) Shanmugarajan S et al.: Bone loss in survival motor neuron (Smn<sup>-/-</sup>-SMN2) genetic mouse model of spinal muscular atrophy. *J. Pathol.*, 219: 52-60 (2009)
- 41) Lu S et al.: Synergistic inhibitory activity of zoledronate and paclitaxel on bone metastasis in nude mice. *Onco. Rep.*, 20: 581-587 (2008)
- 42) Kumar S et al.: A highly potent inhibitor of cathepsin K (relacatib) reduces biomarkers of bone resorption both in vitro and in an acute model of elevated bone turnover in vivo in monkeys. *Bone*, 40: 122-131 (2007)
- 43) Fan TM et al.: The Bone Biologic Effects of Zoledronate in Healthy Dogs and Dogs with Malignant Osteolysis. *J. Vet. Intern. Med.*, 22: 380-387 (2008)
- 44) Yoon K-H et al.: The Change of Bone Metabolism in Ovariectomized Rats : Analyses of MicroCT Scan and Biochemical Markers of Bone Turnover. *J. Korean Neurosurg. Soc.*, 51: 323-327 (2012)
- 45) Saadiah Abdul Razak H et al.: Combined Effects of *Eurycoma longifolia* and Testosterone on Androgen-Deficient Osteoporosis in a Male Rat Model. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, 2012: 872406 (2012)
- 46) Cho D-C et al.: A synergistic bone sparing effect of curcumin and alendronate in ovariectomized rat. *Acta. Neurochir.*, 154: 2215-2223 (2012)
- 47) Stolina M et al.: RANKL inhibition by osteoprotegerin prevents bone loss without affecting local or systemic inflammation parameters in two rat arthritis models: comparison with anti-TNF $\alpha$  or anti-IL-1 therapies. *Arthritis Res. Ther.*, 11: R187 (2009)
- 48) Chang IC et al.: Increased serum osteopontin is a risk factor for osteoporosis in menopausal women. *Osteoporos. Int.*, 21: 1401-1409 (2010)
- 49) Ono N et al.: Osteopontin negatively regulates parathyroid hormone receptor signaling in osteoblasts. *J. Biol. Chem.*, 283: 19400-19409 (2008)
- 50) Valverde P et al.: Overexpression of Bone Sialoprotein Leads to an Uncoupling of Bone Formation and Bone Resorption in Mice. *J. Bone Miner. Res.*, 23: 1775-1788 (2008)
- 51) Mainini G et al.: Serum osteoprotegerin correlates with age and bone mass in postmenopausal, but not in fertile age women. *Clin. Exp. Obst. Gyn.*, 38: 355-359 (2011)
- 52) Wang et al.: MiR-133a in human circulating monocytes: a potential biomarker associated with postmenopausal osteoporosis. *PLoS One*, 7:e34641 (2012)
- 53) Tooley, K.L.: Mucositis and non-invasive markers of small intestinal function. *Cancer Biol. Ther.*, 8: 753-758 (2009)
- 54) Tran, C.D. et al.: Dietary supplementation with zinc and a growth factor extract derived from bovine cheese whey improves methotrexate-damaged rat intestine. *Am. J. Clin. Nutr.*, 77: 1296-1303 (2003)
- 55) van Ampting, M.T. et al.: Intestinal barrier function in response to abundant or depleted mucosal glutathione in *Salmonella*-infected rats. *BMC Physiol.*, 9: 1-9 (2009)
- 56) Sun, J. et al.: Effect of propofol on mucous permeability and inflammatory mediators expression in the intestine following traumatic brain injury in rats. *Cytokine*. 40: 151-156 (2007)
- 57) Frias R. et al.: Comparison of 51chromium-labeled ethylenediamine tetra-acetic acid and iohexol as blood markers for intestinal permeability testing in Beagle dogs. *Vet. J.* 192: 123-125 (2012)
- 58) Melichar, B. et al.: Intestinal permeability, vitamin A absorption and serum alpha-tocopherol during therapy with gefitinib. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*,