

ICH  
International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Human Pharmaceuticals

### 解析結果 (3)

Negative classes	No. compounds	positive in rats
Opiates	5	0
Antidepressants	10	3
Other 5HT related comp	2	0
Remain CNS comp	8	1
Alpha-2 agonists	6	0
ACE-inhibitors	11	2
Beta-blockers	22	2
Alpha-1 blockers	6	2
Antidiabetics (sulphonyl)	11	3
Remain Respiratory	13	3
Antiinflammatory	28	6
H1 antihistamines	17	2

ICH 13

ICH  
International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Human Pharmaceuticals

### 2年間ラット試験における新規の非腫瘍性病変の再解析(MHLW)

- 2007年～2010年に厚生省で承認された59の医薬品におけるラット2年間がん原性試験について調査した。
- ラット2年間がん原性試験のみで観察された非腫瘍性病変に関連しそうな臨床上の有害影響が認められたが、一例を除いてそれらの有害影響は薬理作用または慢性毒性試験成績から予測可能と考えられた。
- プレガバリンの事例では、ラット2年間がん原性試験における非腫瘍性病変と関連ありそうな臨床上の有害影響が認められた。

ICH  
International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Human Pharmaceuticals

医薬品	薬理作用	2年間試験の投与経路	非腫瘍性病変	臨床上の副作用	備考
トルバプタン	バソプレシン V2-受容体遮断	経口	腎玉拡張、肝細胞肥大、胃壊死	腎不全、悪心、下痢、便秘、肝機能異常	ラット6か月試験で尿検査異常、肝機能異常
テリパチド	上皮小体ホルモン (適応症: 骨粗しょう症)	皮下	慢性進行性腎症 (ラットの加齢性病変)	腎結石、頻尿、クレアチニン上昇	ラット6か月試験で腎臓の変化
イルベサルタン	血圧降下	経口	腎臓の慢性炎症、腎尿管過形成	腎不全	ラット6か月試験で糸球体装置過形成

6か月試験の成績で予測可能

ICH  
International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Human Pharmaceuticals

医薬品	薬理作用	2年間試験の投与経路	非腫瘍性病変	臨床上の副作用	備考
モメタゾンフランカルボン酸水和物	ステロイド	吸入	白内障、眼内の炎症、角膜炎	眼内圧亢進	白内障 (ステロイドの効果として)
アンプリセントン	エンドセリン受容体アンタゴニスト	経口	心筋肥大	心不全	ラット6か月試験で心筋肥大
デュタステライド	ジヒドロテストステロン合成阻害剤 (適応症: 前立腺肥大症)	経口	精巣萎縮・変性	性機能異常	イヌ6か月試験で精巣と前立腺の萎縮、精巣上皮の空胞変性

薬理作用及び6か月試験の成績で予測可能

ICH  
International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Human Pharmaceuticals

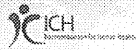
医薬品	薬理作用	2年間試験の投与経路	非腫瘍性病変	臨床上の副作用	備考
合成プロゲステロン; エチニルエストラジオール	ホルモン避妊薬	経口	肝臓における色素沈着マクロファージ	肝機能異常	
アログリプテン	適応症: 糖尿病	経口	肝細胞空胞変性	肝機能異常、黄疸	
リファブチン	抗酸菌症治療薬	経口	皮膚褐色化、胃粘膜線維化、筋線維空胞変性	皮膚炎、胃炎、筋炎	
エベロリムス	mTOR阻害剤	経口	骨格筋萎縮	筋肉痛 (<1%)	

関連性は不明

ICH  
International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Human Pharmaceuticals

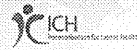
### プレガバリンカプセル

- ✓ 適応症: 末梢性神経痛
- ✓ 4週間、13週間及び52週間のラット反復投与毒性試験において、網膜病変なし
- ✓ ラット2年間がん原性試験においてのみ網膜変性または萎縮
- ✓ 本邦の臨床試験において眼に関する副作用(かすみ目等)
- ✓ ただし、眼に対するこれらの影響は、ラット2年間がん原性試験終了前に、臨床試験で気づかれていた。



## 2年間ラット試験における非腫瘍性病変のまとめ(FDA)

- 2年間のラットがん原性試験において、重要な新規の非腫瘍性病変が発生する。
- スポンサー及びFDAは、薬理作用、非げっ歯類毒性試験等において、所見を予測できなかった。
- このような事例の頻度は不明であるが、小さそうではある。
- このような事例を回避する明確な方法がない。
- いくつかの事例は見逃されることになる。



## CAD記載すべき内容

- WOEの要素の記載
- 計画中／進行中の2年間ラットがん原性試験について予測される試験結果(陽性／腫瘍発生に対する標的臓器、または陰性)
- がん原性試験に関する総合評価およびヒトに対するリスク評価における2年間ラットがん原性試験結果の実施意義の予測
- CADが1)2年間ラットがん原性試験の実施、または2)2年間試験の免除申請のどちらを裏付けるのかについての明確な記述および説明と、それぞれの化合物のカテゴリー分類



## 2年間ラットがん原性試験結果の受領後のCADの再評価

- CADに記載されたWOEに基づく2年ラットがん原性試験での腫瘍発生予測と実際の結果を比較し、予測が正確であったかどうか
- 実施されたがん原性試験の総合的な結果と比較し、企業及び各DRA当局が行ったカテゴリー分類が正確であったかどうか
- 腫瘍発生予測と実際の腫瘍発生に差異があった場合、規制にどのような影響を及ぼすか



## 次のステップとタイムライン

- S1 EWG 規制側代表は、各極において来年2月前にpublic input のためのRNDを公表する。
- 次回 face-to-face 会合前の2013年6月までに、public commentsを集約する。
- RNDの公表前には必要ないが、現在議論中のtopics (非腫瘍性病変やCADs の例示等)を科学雑誌に掲載する。



RNDに対するコメント、製薬メーカーにとってはCAD提出にご協力をお願いします。

平成24年度厚生労働省科学研究費補助金  
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

H24-医薬-指定-026  
医薬品の品質、有効性及び安全性確保のための規制の国際調和の推進に係わる研究

非臨床安全性1部会

## 光毒性試験に関する研究

## 目的

本研究の目的は、医薬品の非臨床安全性評価における光毒性試験のあり方に関して、現状を検証し、問題点を抽出し、以てICHにおける国際協調ガイドライン作成に貢献することである。

## 分班組織

・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*	(MHLW, PMDA)
	苗木 修*	(MHLW, PMDA)
	関澤 信一*	(MHLW, PMDA)
	細井 一弘*	(JPMA, 参天製薬株式会社)
	中村 和市*	(JPMA, 塩野義製薬株式会社)
	白菊 敏之	(JPMA, 大塚製薬株式会社)
	小島 肇	(国立医薬品食品衛生研究所)
	尾上 誠良	(静岡県立大学)
	田中 憲穂	(食品薬品安全センター/鳥取大学)
・アドバイザー	岩瀬 裕美子*	(JPMA, 田辺三菱製薬株式会社)

\*ICH S10 IWGメンバー

## 分班会議実績

1. 第1回分班会議：2012年5月9日  
於：PMDA
2. 第2回分班会議：2013年3月6日  
於：東京都健康安全研究センター  
(予定)

## ICH S10 EWG

EU	Ulla Wandel Liminga	Medical Products Agency
EFPIA	Phil Wilcox	GlaxoSmithKline R&D Ltd
	Daniel M. Bauer	Novartis Pharma AG
MHLW	Dai Nakae	Tokyo Metropolitan Institute of Public Health
	Hiroshi Onodera	PMDA
	Osamu Fueki	PMDA
	Shinichi Sekizawa	PMDA
JPMA	Kazuhiro Hosoi	Santen Pharmaceutical Co., Ltd.
	Kazufichi Nakamura	Shionogi & Co., Ltd.
	Yumiko Iwase	Mitsubishi Tanabe Pharma Co., Ltd.
FDA	Abigail (Abby) Jacobs	CDER
	Paul C. Brown	CDER
PhRMA	Lewis Kinter	AstraZeneca Pharmaceuticals
	Roderick Todd Bunch	Bristol-Myers Squibb
EFTA	Claudine Faller	Swissmedic
WSMI	Olaf Kelber	Steigerwald Arzneimittelwerk GmbH
DRA of Korea	Chae Hyung Lim	National Institute of Food and Drug Safety Evaluation

\*そのほか、実務には参加しない「メンバー」が存在。

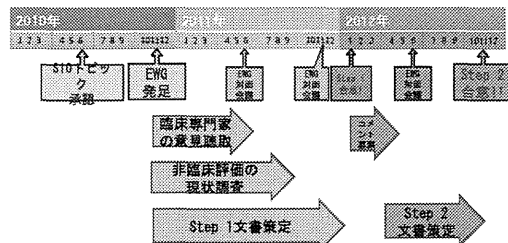
## ICH会議実績

1. 福岡会議：2012年6月2-7日  
於：ヒルトン福岡シーホークホテル
2. 会議：2012年11月10-15日  
於：Hilton San Diego Bayfront

## ICH S10 EWG電話会議実績

1. 2012年7月10日
2. 2012年9月12日
3. 2012年9月25日
4. 2012年10月9日
5. 2012年10月17日

## ICH S10ガイドライン作成の経緯



現在パブリックコメントを募集中【2月28日まで】：応募をお待ちしています。  
 (ただし、お手柔らかに?!)  
<http://search.e-gov.go.jp/servlet/Publio?CLASSNAME=PCMMSTDETAIL&id=495120309&Mode=0>

## ICH S10 Step 2ガイドライン 和訳文書の構成

1. 結語	1
1.1 ガイドラインの目的	1
1.2 背景	1
1.3 適用範囲	1
1.4 一般原則	1
2. 光安全性評価において考慮すべき要因	2
2.1 光化学的特性	2
2.2 組織分布/ファーマコキネティクス	3
2.3 代謝物に関して	4
2.4 薬理学的特性	4
3. 非臨床光安全性試験	4
3.1 一般的概念	4
3.2 化学的試験法を用いた光毒性試験	5
3.3 <i>in vivo</i> 試験法を用いた光毒性試験	5
3.4 全身適用薬の <i>in vivo</i> 光安全性試験	6
3.5 局所適用薬の <i>in vivo</i> 光安全性試験	7
3.6 眼局所適用薬の <i>in vivo</i> 光安全性試験	8
4. 試験手続	8
4.1 全身適用薬に推奨される試験手続	8
4.2 局所適用薬に推奨される試験手続	9
4.3 眼局所適用薬に推奨される試験手続	10
6. 注釈	11
7. 用語の解説	13
8. 参考文献	13

## ICH S10 Step 2ガイドラインのポイント(1)

### 目的と背景

・ICH M3 R(2) Section 14の光安全性試験の項を基に、具体的な評価手順を定める。

### 適用範囲

・全身適用薬の新規有効成分と新規添加物・局所適用製剤・皮膚貼付剤・眼科用剤・光線力学療法に用いられる薬剤の臨床製剤に適用される。

・一般的に、ペプチド・蛋白・薬剤結合型抗体・オリゴヌクレオチドに適用されない。

・新たな懸念が生じない限り、既上市薬に適用されない。

### 一般原則

・光毒性・光アレルギー性・光遺伝毒性・光がん原性を定義した上で、後二者の試験法が有用でないとして、光毒性・光アレルギー性のみを対象とする。

## ICH S10 Step 2ガイドラインのポイント(2)

### 光化学的特性

・UVB・UVA・可視光 (290-700 nm) 吸収性で判断する。

・モル吸光係数 (molar extinction coefficient、以下、MEC) が  $1000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 未満の物質に光安全性の懸念がないとする。

・照射後の活性酸素種 (ROS) 生成を、光毒性ポテンシャルの指標と捉える。

### 組織分布/ファーマコキネティクス

・メラニン結合性のみが、必ずしも光毒性の懸念にならないとする。

・組織分布の閾値を設定できないとし、ケースバイケースで光安全性評価実施に関する根拠に使用するものとする。

➢ 血漿/組織濃度比の低いか皮膚に蓄積しない全身適用薬について、FDAが光毒性の更なる評価を一般的に必要としないのに対し、EU・MHLWが必ずしも同様に対応できないとしている。

## ICH S10 Step 2ガイドラインのポイント(3)

### 代謝物に関して

・個別に光安全性評価を行う必要がないとしている。

### 薬理学的特性

・光刺激性から皮膚発がんに至る紫外線の効果を増幅する可能性がある免疫抑制やヘム合成異常を除けば、重要視しない。

### 非臨床光安全性試験、一般的概念

・高い感度と特異性の両立が望ましいが、偽陰性を減らすべく感度を優先する。

・ソーラーシミュレータの放射照度と照射時間を、照射スペクトルのUVA領域に基いて標準化すべきであるものとする。

・ヒト皮膚においてUVBが表皮を超えないのに対し、UVAが血管中の血液にまで到達するとし、全身適用薬のUVBの影響がUVAに比べて臨床重要でないとしている。

#### ICH S10 Step 2ガイドラインのポイント(4)

##### 化学的試験法を用いた光反応性試験

•バリデーション実施中のROSアッセイについて、高感度低特異性であり、陰性結果が光毒性陰性を示唆できる一方で、陽性結果でもフォローアップ試験が必要であるとする。

##### *In vitro*試験法を用いた光毒性試験

•3T3ニュートラルレッド取り込み光毒性試験(3T3 NRU-PT)について、陰性結果が光毒性陰性を示唆できる一方で、陽性結果でもフォローアップ試験が必要であるとする。

•3T3 NRU-PTの最高濃度を100 µg/mLとし、PIF値2-5あるいはMPE値0.10-0.15であれば、全身適用薬において更なる試験が必要ないものとする。

•3T3 NRU-PTでヒトの光曝露組織における濃度より高濃度でのみ陽性であれば、原則的に*in vivo*の試験が必要ないものとする。

#### ICH S10 Step 2ガイドラインのポイント(5)

##### *In vitro*試験法を用いた光毒性試験

•UVBのみに吸収をもつ皮膚外用剤について、ヒト皮膚再構築モデル等での評価が望ましいが、条件の調整が重要とする。

•眼における光毒性を評価する*in vitro*モデルは存在しないものとする。

##### 全身適用薬の*in vivo*光安全性試験

•バリデートされた*in vivo*光安全性試験モデルが存在しないので、best practiceとして考慮すべきであるものとする。

•光毒性の初期徴候を、紅斑とその後に発現する浮腫とする。

•網膜への光毒性について、400 nm以上の波長に吸収を示す物質を対象として病理組織学的に評価するものとする。

•*In vivo*光アレルギー試験を推奨しない。

#### ICH S10 Step 2ガイドラインのポイント(6)

##### 経皮適用薬の*in vivo*光安全性

•全身適用薬に関する推奨内容に準拠するものとする。

##### 眼局所適用薬の*in vivo*光安全性試験

•標準化された*in vivo*モデルが存在しないものとする。

##### 臨床における光安全性評価

•臨床試験における標準的な有害事象報告から臨床での光安全性評価に特化した試験までの様々なオプションからケースバイケースで決定するものとする。

#### ICH S10 Step 2ガイドラインのポイント(7)

##### 全身適用薬に推奨される評価手法

•難溶性物質などで、3T3 NRU-PTの代わりに、動物・ヒトを用いた光毒性試験を初期評価として実施することが可能とする。

•適切に実施した*in vivo*光毒性試験における陰性結果を、3T3 NRU-PTの陽性結果に優先させる。

•適切に実施した臨床光毒性評価における陰性結果を、動物試験の陽性結果に優先させる。

•動物試験あるいは臨床試験が実施されていれば、3T3 NRU-PTを実施する必要がないものとする。

#### ICH S10 Step 2ガイドラインのポイント(8)

##### 経皮適用薬に推奨される評価手法

•MHLWとEUIにおいて光反応性評価(RoSアッセイ)の陰性結果を以て更なる光安全性評価が不要と判断するが、FDAが販売用製剤を用いた臨床光安全性評価を不要としない。

•MECが1000 L mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>を超える有効成分あるいは新添加物を含む経皮投与製剤について、光アレルギー性の評価が必要とし、臨床光安全性評価に販売予定の製剤を用いることを推奨し、第Ⅲ相臨床試験の間に実施することができるものとする。

##### 眼局所適用薬に推奨される評価手法

•硝子体内など水晶体より後方に投与される化合物が400 nm未満の波長しか吸収しない場合、光毒性の懸念が低いものとする。

•MHLWとFDAにおいて眼局所適用薬の光毒性の実験的評価が推奨されないのに対し、EUIにおいてハザード同定に十分なデータがなければ代替投与経路での実験的評価が推奨されるものとする。

## まとめ

• ICH S10 EWGは、今後、各パーティにおけるパブリックコメントを集約し、それらへの対応を議論した上で、2013年6月のICHブリュッセル会議を経て、同11月のICH大阪会議におけるstep 4到達を目指している。

• 本分班は、研究目的の達成に向けた作業を粛々と進める一方で、前項の推移を注視し、事態の変化に即応できる体制を整える。

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：  
医薬品の品質、有効性及び安全性確保のための規制の  
国際調和に係る研究  
平成24年度班会議総会

## バイオ医薬品の 新しい課題に関する研究

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  
平林 容子

1

## 目的

- ▶ 日米EU医薬品規制調和国際会議における、バイオ医薬品の非臨床安全性試験法に関するS6ガイドラインの、カテゴリーベースでの明確化と拡充の必要性に対応したアップデートの手段としての補遺の策定を支援する為の関連情報の収集や解析にかかる先行研究に引き続き、関連事項に関するフォローアップ並びに新たな問題点の洗い出しとその調査研究を行うこと。

2

## 方法

- ▶ ガイドライン通知発出後のフォローアップ
  - ▶ パブリックコメントへの対応の公表
- ▶ 改訂ポイントの国内周知：
  - ▶ 「非臨床試験ガイドライン解説」の改訂
- ▶ 関連する諸問題の検討
  - ▶ パブリックコメントへの対応などから派生した課題、など

3

## 研究班の構成

### 研究分担者

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 平林 容子

### 協力研究者

独立行政法人 医薬品医療機器総合機構 再生医療製品等審査部 真木 一茂

独立行政法人 医薬品医療機器総合機構 ワクチン等審査部 松本 峰男

中外製薬株式会社 研究本部 渡部 一人

第一三共株式会社 安全性研究所 三分一所 厚司

塩野義製薬株式会社 開発薬事部 中村 和司

アンジェスMG株式会社 中澤 隆弘

### オブザーバー

独立行政法人 医薬品医療機器総合機構 小野寺 博志

独立行政法人 医薬品医療機器総合機構 井上 達

4

## S6 (R1) に関する経緯の概略 (1)

- ▶ 2008年6月 ICHポートランド会議
  - ▶ 各極から提案されたS6ガイドラインの改訂点を集約し、最終的に5項目に限定して、既存ガイドラインは保持したまま、このものの明確化と最新化を目的とした補遺を作成すること、この際、動物種別(3R)の原則を考慮すること、で各極の合意が得られ、ICH S6(R1)として、EWGが構成された
- ▶ 2009年10月 ICHセントルイス会議
  - ▶ 補遺文書の完成/Step 2に到達
- ▶ 2010年1-3月 パブコメ収集
- ▶ 2011年6月12日 ICHシンシナティ会議直前のポスタルサインオフ/Step 4に到達

5

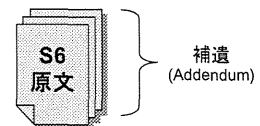
## S6 (R1) 作成の目的

- ▶ 現行のS6ガイドラインに説明を加えることにより、バイオ医薬品の効率的な開発促進と実験動物使用削減(3R)を目指す

- ▶ ケース・バイ・ケースの基本理念は変えない(原文)

- ▶ 5項目について補遺(Addendum)を作成する

- ▶ 動物種の選択
- ▶ 試験デザイン
- ▶ 免疫原性
- ▶ 生殖発生毒性
- ▶ がん原性



6

## S6 (R1) に関する経緯の概略 (1)

- ▶ 2008年6月 ICHポर्टランド会議
  - ▶ 各極から提案されたS6ガイドラインの改訂点を集約し、最終的に5項目に限定して、既存ガイドラインは保持したまま、このものの明確化と最新化を目的とした補遺を作成すること、この際、動物愛護(3Rs)の原則を考慮すること、で各極の合意が得られ、ICH S6(R1)として、EWGが構成された
- ▶ 2009年10月 ICHセントルイス会議
  - ▶ 補遺文書の完成/Step 2に到達
- ▶ 2010年1-3月 パブコメ収集
- ▶ 2011年6月12日 ICHシンシナティ会議直前のポータルサインオフ/Step 4に到達

▶ 7

## S6 (R1) ガイドラインの構成

日米EU医薬品規制調和国際会議(ICH)  
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(R1)  
ステップ4版

- ▶ 第一部 = 現行(当時)ICH S6ガイドライン
- ▶ 第二部 = 新たに合意に達した補遺文書
  1. 緒言
  2. 動物種を選択
  3. 試験デザイン
  4. 免疫原性
  5. 生殖発生毒性
  6. がん原性

▶ 6

## S6 (R1) に関する経緯の概略 (2)

- ▶ 2011年6月～ Step 4最終文書の和訳作業
- ▶ 2012年3月23日 国内対応ガイドライン(Step5文書)の通知発出
  - 薬食審査発0323第1号(平成24年3月23日)
- ▶ 2012年4月～ パブコメ対応についてのまとめ
- ▶ 2012年8月24日 パブコメ結果の公表
  - 電子政府の総合窓口\*にアップロード
  - \* 電子政府の総合窓口(e-Gov:イーガブ): 総務省行政管理局が運営する総合的な行政情報ポータルサイト

▶ 9

パブリックコメントへの対応

## パブリックコメントの収集

- ▶ 収集期間: 平成22年1月8日～3月8日
- ▶ 国内のコメント数: のべ194項目(70項目程度に集約)
- ▶ 提出者
  - ▶ 日米EUの製薬企業 (20社超)
  - ▶ ICH 規制当局 (FDA, EMA, MHLW/PMDA, PEI)
  - ▶ 学術団体 (STP, ESTP)
  - ▶ 動物愛護団体 (ICAPP, NC3R's)
  - ▶ ICH以外の規制当局 (e.g. Health Canada, Singapore, Korea, China)

▶ 10

パブリックコメントへの対応

## パブリックコメントの再整理

- ▶ 収集したコメントを集約した約70項目のリストを基に、S6(R1)と照合し、パブリックコメントの対象となる項目を選択
- ▶ 最終的に26項目に対して、S6(R1)での対応の状況を文章化
- ▶ e-GOVに掲載(厚労省医薬食品局審査管理課 平成24年8月24日)(URL: <http://search.e-gov.go.jp/servlet/Public?CLASSNAME=PCMNSTDETA1L&id=495090260&Mode=2>)

▶ 11

「医薬品非臨床試験ガイドライン解説」の改訂

## 改訂ポイントの国内周知

- ▶ S6(R1) 緒言
  - ▶ 第一部と第二部との関係について
  - ▶ 第二部は第一部を補完するものである。
  - ▶ 記載内容に差異がある場合は、第二部の記載が優先される。
- ▶ 両者を統合した何らかの解説の必要性
- ▶ 「医薬品非臨床試験ガイドライン解説」を利用

▶ 12

## 公表するためのフォーマット

- ▶ Q&A
  - ▶ ケースバイケースの対応が正しく伝わらない危険性
  - ▶ EWGでの確認など、国内対応だけで完結しない
- ▶ 誌上発表(学会誌など)
  - ▶ ガイドラインの性格上、執筆者名の扱いに問題
- ▶ 非臨床試験ガイドライン解説 2013年版の出版準備が進行中
  - ▶ 出版時期が
  - ▶ いずれ改訂の際にはとりまとめる必要がある
  - ▶ 公表の形式としては最適

## 執筆にあたっての留意点

- ▶ 読者のより深い理解を助けることを目指し、S6(R1)の第一部(旧ガイドライン)と第二部(新規作成補遺文書)との間の記載の差異を整理し、必要に応じて解説を加える。
- ▶ 項目立ては、2010年版の「医薬品非臨床試験ガイドライン解説」を参考にする。
- ▶ 記載内容は第一部の記載に第二部の内容を盛り込んで統合した内容とする。

## 今後の予定

新規バイオ医薬品などに対する継続した情報収集や、S6(R1)の今後の改訂の要否などに関わる調査研究を進める

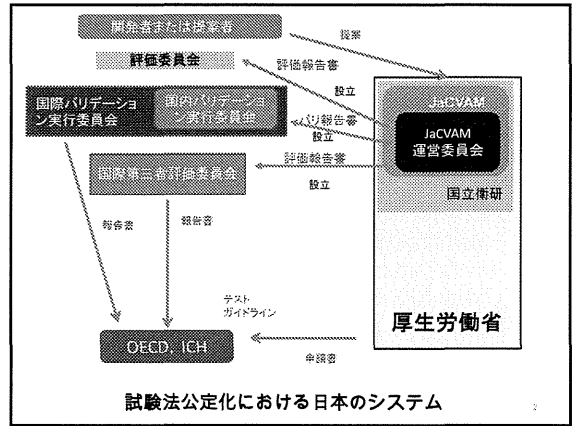


医薬品の品質、有効性及び安全性確保のための規制の  
国際調和の推進に係わる研究(H24-医薬-指定-026)班会議  
平成25年2月7日、東京

## In vitro安全性試験に関する研究



国立衛研  
小島 肇



### ICATM 組織

ICATM is a preliminary international organization of national organizations: Canada, the European Union, Japan, South Korea, and the United States

Health Canada, NICEATM-ICCVAM, ECVAM, KoCVAM, JaCVAM

JACVAM Activities

Update on JACVAM (15 June 2009 updated)

Classification	Task/Action	USA/NIH	Japan/NIH	EU/EMA	South Korea/MSIP	Other
CD	CD (Cytotoxicity) test	○	○	○	○	○
CD	CD (Cytotoxicity) test (New test method)	○	○	○	○	○
CD	CD (Cytotoxicity) test (New test method)	○	○	○	○	○
CD	CD (Cytotoxicity) test (New test method)	○	○	○	○	○
CD	CD (Cytotoxicity) test (New test method)	○	○	○	○	○
CD	CD (Cytotoxicity) test (New test method)	○	○	○	○	○
CD	CD (Cytotoxicity) test (New test method)	○	○	○	○	○
CD	CD (Cytotoxicity) test (New test method)	○	○	○	○	○
CD	CD (Cytotoxicity) test (New test method)	○	○	○	○	○
CD	CD (Cytotoxicity) test (New test method)	○	○	○	○	○

### 国際調和研究会「医薬品安全性評価法に関するOECD」の記

New TG: PBTG for the establishment of human-derived hepatic system to investigate biotransformation and toxicity of compounds, by evaluation of cytochrome P450 induction competence (European Commission)

OECD SPSPs received by 22 November 2012

略号:  
SPSF: Standard Project Submission Form  
PBTG: Performance- Based Test Guideline

### Regulatory Guidance For DDI

- FDA (Feb, 2012) DRAFT Guidance- Drug Interaction Studies — Study Design, Data Analysis, Implications for Dosing, and Labeling Recommendations
- EMA (April, 2010) DRAFT Guideline on the Investigation of Drug Interactions

## EMA Guidance

- Mentions in several places that an *in vitro* model (e.g. human hepatocytes) for induction testing can be used for testing down-regulation.

– “These studies (induction) will also detect enzyme down-regulation...”

– “mRNA could also be included and is mandatory for the interpretation of study results... if a down-regulation is suspected based on the activity assay.”

- Does not discuss the interaction with TPs.

7

## FDA Guidance

- If an investigational TP is a cytokine or cytokine modulator, studies should be conducted to determine the TP's effects on CYP enzymes or transporters.
- *In vitro* or animal studies have limited value in the qualitative and quantitative projection of clinical interactions.
- The *in vivo* evaluations of TPs in targeted patient populations can be conducted.
- When there are known mechanisms or prior experience with certain PK or PD, interactions, appropriate *in vitro* or *in vivo* assessments for possible interactions should be conducted.
- Does not discuss *in vitro* model or experimental details for study on CYP suppression by TP or small molecules.

8

## Context

- Toxicokinetics as a key to integrated safety assessment when based primarily on non-animal approaches
- From classical toxicological safety assessment towards a non-animal based safety assessment for systemic toxicity:
  - Toxicokinetic ADME information is a pre-requisite for alternatives predicting human *in vivo* systemic toxicity
  - Framework to use PBTK modeling
  - Metabolism still a bottleneck for TK and toxicodynamic (TD) applications?

11-03 October 2012

9

## Objectives of the CYP validation project

Objectives :

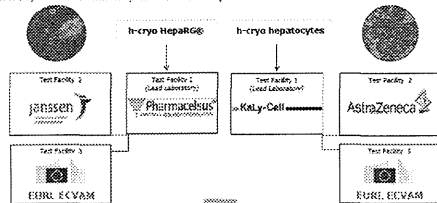
1. assess the long term metabolic competence (*plateable cell system; 48-72h repeated dose*) of the Test System (TS)
  2. provide a reliable (*assessed by cytotoxicity & induction assay protocols*) TS for TK and TD applications
  3. assess a preliminary predictive capacity – *CYP induction (2A2; 2B6; 2C8; 3A4)*
- applicability of the Test Method (TM) at the regulatory level (*pharma sector*) & MoA assay protocol (*all sectors*)

10

## Project design of the CYP validation project

Test Systems (TS):

1. cryopreserved human HepaRG® cells
2. cryopreserved human primary hepatocytes

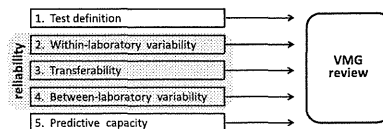


21-22 October 2012

11

## Project design of the CYP validation project

Modular approach as defined by Hartung et al.



12

### Project design of the CYP validation project

**Test systems**

- Cryopreserved HepaRG<sup>®</sup> cell line**
  - Stable cell line
  - From hepatocarcinoma of patient
  - 1 donor
- Primary cryopreserved hepatocytes**
  - Gold standard for *in vitro* induction
  - At least 3 donor (EMA & FDA)

**FD&A ⇒ EMA (endpoint)**

- m-RNA only (FDA)
- m-RNA recommended; catalytic activity if induction due to protein stabilization suspected (EMA)

20-22 October 2012

### Project design of the CYP validation project

**Test items**

Module 1-2-3: omeprazole (AHR) and truglitazone (CAR and PXR) proposed by the test submitters and agreed by VMG

Module 4: 19 coded test items selected by VMG based on human induction data and nuclear receptor info available in literature

20-22 October 2012

### milestones & deliverables of the CYP validation project

	HepaRG	crvohep
1. Test definition	completed	completed
2. Within-laboratory variability	completed	completed
3. Transferability	completed	completed
4. Between-laboratory variability	module4a	subcytotox
5. Predictive capacity	module4b	completed

reliability

10

10

### 現在までの対応状況と今後の課題

- 国立衛研 薬理部 藤内桃子博士をECVAMバリデーション実行グループに参加させ、情報収集に務めてきた。
- OECD SPSFの内容については、バリデーションが終了しておらず、TG申請は早急すぎるとのコメントを昨年11月に日本として発信した。
- OECD WNT (4月)会議の状況により、本試験法の評価委員会の立ち上げをJaCVAM運営委員会に提案することを計画している。

11

## 安全性評価のための バイオマーカーについての調査

国立医薬品食品衛生研究所  
大野泰雄

### バイオマーカーに関する調査

Biomarkerとは、

- 「正常なプロセスや病的プロセス、あるいは治療に対する薬理学的な反応の指標として客観的に測定・評価される項目」  
(Aloka G. Chakravarty, FDA, 2003、日本薬学会誌)

新薬開発では、

- より早く、より経済的に候補物質の臨床での作用を予測し、意志決定に必要な検体必要量の削減と迅速化を計るために、長期間で現れる変化を短時間で現れる指標に置き換える。

本研究では、

- 安全性評価のためのバイオマーカーを調査した。

### バイオマーカーに関する調査

研究分担者

高橋光一(久光製薬)  
小林章男(日本たばこ)

研究協力者

宇山佳明(医薬品医療機器総合機構)  
熊谷雄治(北里大学)

製薬協 基礎研究部会 一般毒性課題対応チーム

久田 茂 (あすか製薬)	田口和彦 (アリストル・マイヤース)
本山径子 (ヤンセンファーマ)	荻野大和 (トアエイゴ)
永山 隆 (ユーシービー・ジャパン)*	佐神文郎 (エーザイ)*
下元貴澄 (帝人ファーマ)#	戸田秀一 (田辺三菱)#
韓大健 (日本イーライリリー)#	友廣雅之 (日本アルコン)#
佐々木正治 (アッヴィ)#	鈴木 睦 (協和発酵キリン)#

\*: 平成23年度、#: 平成24年度

### バイオマーカーに関する調査

平成23年度

- 高橋光一(久光製薬): 心臓、筋肉、神経毒性
- 小林章男(JT)、製薬協 基礎研究部会  
: 肝障害・脂肪化、血管炎・肺炎、精巣毒性
- 大野泰雄: 肝腎毒性に関わるTGバイオマーカー

平成24年度

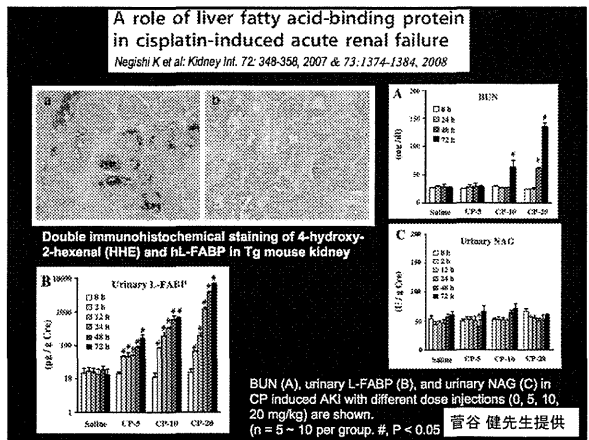
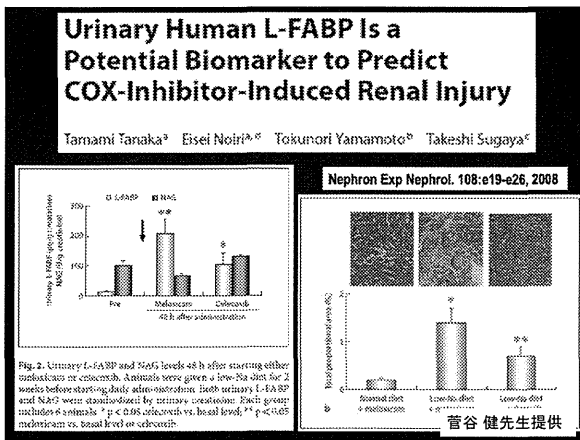
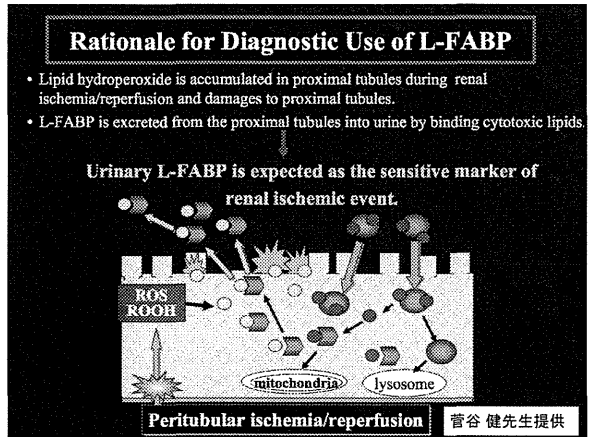
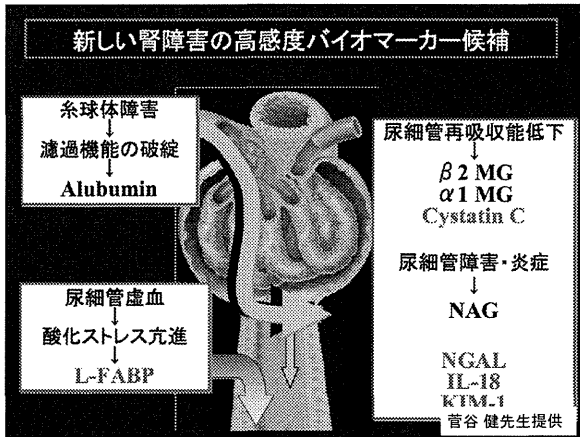
- 高橋光一(久光製薬): 追跡調査
- 小林章男(JT)、製薬協 基礎研究部会  
: 昨年度の追跡調査、骨毒性、消化管毒性
- 大野泰雄: まとめ、腎毒性

## 安全性評価のための バイオマーカーの検討例

- 腎毒性: 尿中KIM-1, Albumin, Total Protein,  $\beta_2$ -Microglobulin, Cystatin C, Clusterin, Trefoil factor-3, Renal Papillary Antigen-1 (RPA-1) \*赤字: 日米欧の行政当局で確認、青字: FDA, EMAが適格性確認
- 心毒性: Troponin(Tn)類, Heart-type fatty acid binding protein(H-FABP), brain natriuretic peptide(BNP)、NT-proBNP
- 筋肉毒性: FABP3, fsTnl, Parvalbumin-a, miR-133a
- 神経毒性: SBDP ( $\alpha$ -II-Spectrin Break Down Product)と Cleaved-Tau, S-100 $\beta$  protein, Myelin Basic Protein (MBP), Neuron-Specific Enolase (NSE)

(大野泰雄、高橋光一、池田孝則、日原太郎、宇山佳明、熊谷雄治:  
H22年度厚生労働科学研究費報告書より引用)

## 臨床腎毒性マーカー



厚生労働科学研究班会議 (2013.2.7) 資料

# 毒性バイオマーカー

— 心臓、筋肉、神経 —

資料作成: 高橋光一 (久光製薬)

過去2年間と同様、心臓、筋肉、神経領域の毒性バイオマーカーを検索、候補物質を抽出した。

本年度: 2011からの継続分として調査を実施した (2012.12)。

DB検索 (2012に公表された論文) (MEDLINE or EMBASE)

- 1) 心臓  
[Keyword: Biomarker & (heart or cardiac) & toxicity]  
→ 162 件
- 2) 筋肉  
[Keyword: Biomarker & muscle & toxicity]  
→ 105 件
- 3) 神経  
[Keyword: Biomarker & nerve & injury]  
→ 162 件

Tonomura T et al. Toxicology, 302, 179-189 (2012)

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

動物実験とバイオインフォマティクスからのデータを比較検討

検討薬物投与によるマーカー変動を検討

Isoproterenol 1.5mg/kg, i.p.  
Metaproterenol 5mg/kg, i.p.  
Doxorubicin 40mg/kg, i.p.  
Minoxantrone 10mg/kg, i.p.  
Allylamine 100mg/kg, p.o.  
Cyclosporine 300mg/kg, p.o.  
Cyclophosphamide 200mg/kg, p.o.  
Aminoglutethimide 200mg/kg, p.o.  
Acetaminophen 1000mg/kg, p.o.  
Methapyrilene 500mg/kg, p.o.  
Allyl alcohol 50mg/kg, p.o.  
α-naphthylisothiocyanate 150mg/kg, p.o.

SDラット(6W♂): 単回投与

測定項目  
cTnI (Tnni3), cTnT (Tnnt2), sTnI, (Tnni1, Tnni2), FABP3 (Fabp3), Myl3 (Myl3), AST, LDH, CK

測定時間  
投与 1, 2, 4, 8, 24時間後に採血

その後、病理学的検討

Tnni1: troponin I type 1 (skeletal, slow)  
Tnni2: troponin I type 2 (skeletal, fast)

Tissue-specific Gene Expression and Regulation (TIGER)を用いた解析

http://bioinfo.wilmer.jhu.edu/tiger/

Gene: TNNT2 (cTnT)

遺伝子名を入力 → 組織分布

↓

心臓

動物実験の結果と関連する

Experimental designs and summarized pathological alterations in the heart and skeletal muscles

Compound	Cardiac alteration (lesion; grade)	Musculoskeletal alteration (lesion; grade; position)
Isoproterenol	N; ++ to +++ Cl; ++ to +++ E; ++	N; + to ++; S Cl; ++ to +++; G E; + to ++; S
Metaproterenol	N; ++ to +++ Cl; ++ to +++ E; ++ to +++	N; ++; S/ +; G Cl; ++ to +++; G E; ++ to +++; S
Doxorubicin	None	N; ++ to +++; D E; ++; D
Minoxantrone	None	N; + D Cl; + to ++; D E; ++; D
Allylamine	N; ++ to +++ Cl; ++ to +++ E; ++ to +++	N; + sol/ + TM Cl; ++; S E; + S
Cyclosporine	None	N; + S Cl; + to ++; S/ +G E; ++; S

SDラット(6W♂): 単回投与24時間後の解剖所見

S, soleus; G, gastrocnemius; TM, thigh muscle; D, diaphragm; N, necrosis; Cl, cellular infiltration; E, edema; +, slight; ++, mild; +++, moderate

sTnIの測定

Sun D et al. Electrochemiluminescent immunoassay for rat skeletal troponin I (Tnni2) in serum. J Pharmacol Toxicol Method (2010); 61(1): 52-8

Skeletal muscle troponin I (sTnI) has been identified as a potential marker of skeletal muscle injury in humans and animals. When skeletal muscle tissue is injured, sTnI is released into circulation.

We have developed a sensitive and specific assay to detect the concentration of rat sTnI in serum using an electrochemiluminescent (ECL) immunoassay platform with a sensitivity of 2.4 ng/ml and with minimal cross-reactivity with rat cardiac TnI (Tnni3).

Muscle Injury Panel 1 (rat) Kit: cTnI, cTnT, FABP3, Myl3, sTnI を同時測定

http://www.mesoscale.com/CatalogSystemWeb/Documents/Muscle\_Injury\_Panel\_1\_rat.pdf

Sample group (Rat)	Sample dilution	cTnI (μg/mL)	cTnT (μg/mL)	FABP3 (μg/mL)	Myl3 (μg/mL)	sTnI (μg/mL)
Heart Homogenate	100~10000	22.6	25.1	125.2	5.0	<LLOD
Soleus Homogenate (slow twitch)	100~10000	<LLOD	<LLOD	38.8	16.4	18.1
Quad Homogenate (fast twitch)	100~1000	<LLOD	<LLOD	12.2	0.0837	40.9

(この会社では、ヒトsTnIキットは発売されていない) → 再度確認

**FDA: 心毒性評価(非臨床)**

3. Development of Non-Clinical Drug-Induced Cardiotoxicity Biomarkers  
 Briefing Status: ON TRACK  
 Prior Briefing Status: ON TRACK

**マイルストーン: ~2014.7.31**

Milestone Description	Milestone Date	Milestone Status	Milestone Completion Date
a. Initiate start study for development of potential biomarkers (refer to a molecule measured in the blood or other tissue whose concentration reflects the severity or presence of some disease state) of cardiovascular conditions in which there is damage to the heart muscle	11/14/2011	Completed	11/14/2011
b. Complete initial treatments	07/20/12	Completed	07/20/12
c. Complete histology and cardiac T2-weighted MRI events	10/19/2012	On Track	
d. Complete histopathology and analysis of biopsies	10/19/2012	Not Yet Started	
e. Complete electron microscopy analysis of heart tissue	03/29/12	Not Yet Started	
f. Complete gene expression analysis	1/31/2013	Not Yet Started	
g. Complete metabolomic analysis	03/12/13	Not Yet Started	
h. Complete proteomic analysis	4/30/2013	Not Yet Started	
i. Complete data analysis	05/12/13	Not Yet Started	
j. Complete assessment of research findings	10/11/2013	Not Yet Started	
k. Develop draft technical report, manuscript, and/or publication	4/30/2014	Not Yet Started	

<http://www.accessdata.fda.gov/FDA/track/track-proj?program=nctr&id=NCTR-DSB-PM-Develop-Biomarkers-of-Toxicity-and-Disease>

**まとめ**

- 心臓領域は、新規物質の報告も散見されたが全体として大きな変化はない。現在まで臨床も非臨床も報告が積み重ねられ、様々な知見が得られており、データの解釈がし易くなっている。
- 筋肉領域は、神経領域以上に論文数が少なく、特に非臨床での報告は極めて少なかった。
- 神経領域は、今回の検索方法では主に脳損傷関連の報告がヒットした。臨床関係ではS100β等幾つかのマーカーが報告されており、今後さらに普及する可能性がある。一方、非臨床での報告はまだ少なく、特に化学物質の毒性評価に用いられているものは無かった。
- miRNA等の新規マーカーは、バリデーションも含め課題があるものの、今後増々発展していくと考えられる。

**安全性評価のための  
バイオマーカーの検討例**

- 腎毒性: 尿中KIM-1, Albumin, Total Protein, β<sub>2</sub>-Microglobulin, Cystatin C, Clusterin, Trefoil factor-3, Renal Papillary Antigen-1 (RPA-1) \*赤字: 日米欧の行政当局で確認、青字: FDA, EMAが適格性確認
- 心毒性: Troponin類, Heart-type fatty acid binding protein (H-FABP), brain natriuretic peptide (BNP), NT-proBNP, NT-ProAtrial natriuretic peptide (ANP), Nitrogen oxide, miRNAs
- 筋肉毒性: FABP3, fsTnI (sTnI), Parvalbumin-a, miR-133a
- 神経毒性: SBDP (α-II-Spectrin Break Down Product), Cleaved-Tau, S-100β protein, Myelin Basic Protein (MBP), Neuron-Specific Enolase (NSE)

(大野泰雄、高橋光一、小林章男、池田孝則、日原太郎、宇山佳明、熊谷雄治: H22および23年度厚生労働科学研究費報告書より引用)

**理想的な非臨床バイオマーカーとは?**

- 臨床での作用につながる (surrogate endpointやclinical endpointとの相関性が高く、科学的根拠がある)。
- 感度が高い (低用量から高用量の予測、短期試験から長期試験の予測、毒性が潜在的あるいは可逆的な段階で検出できる)。
- 特異性が高い (臓器特異性、毒性種類と程度との対応性が良い)。
- 再現性 (頑健性) が良い。
- 倫理的である。
- 試料採取が非侵襲的で、容易である。
- 測定が簡易で、時間がかからず、経済的である。
- 新薬開発の早期に利用できる。

**今後の課題**

これまでに挙げてきたマーカーを、上記の観点から比較評価する必要がある。

**以下、参考資料**

**心臓**

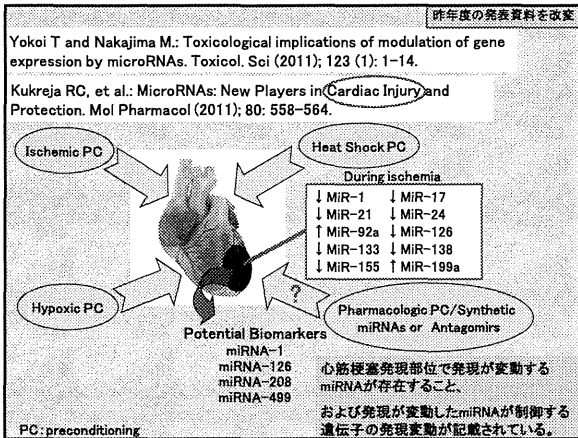
厚生労働科学研究費補助金(医薬品・医療機器等)シキョウリ-サイエンス融合研究事業  
 H22-23年度: 最終研究報告書より抜粋

**H22年度**

- 心毒性マーカーに関して、新規物質の報告が散見されたが大きな変化はない
- ヒト/動物ブリッジング評価方法は向上
- Troponin類、H-FABP、BNPが主体

**H23年度**

- Isoproterenol誘発モデルに加えdoxorubicin誘発モデルが増加
- 新たなマーカー候補としては、Nitrogen Oxideのみ
- cTnTとcTnIの違い: 今回の調査ではcTnI測定が多かった。  
→(cTnTの)特許の縛りが起因?
- 既知マーカー: データの蓄積が続く。
- miRNAについては、測定方法(補正)等課題が多いものの、新規性が高く今後の動向が注目される。



急性心筋梗塞モデルにおけるmiRNAレベル

miRNA	Source	Species	Peak level (fold)	Peak time (hr)	Duration (hr)
miR-1	Plasma	Rat	~800	3	>24
	Serum	Rat	260	6	72
	Plasma	Mice	6	18	72~120
	Plasma	Pig	1.6	2	---
mi-R499	Plasma	Rat	~40-60	3	>24
mi-R499-5p	Plasma	Mice	70	24	70
	Plasma	Pig	1.6	>2	---
mi-R133a	Plasma	Rat	1000	3	>24
	Plasma	Mice	13	6	>72
mi-R133b	Plasma	Mice	13	6	28-72
mi-R208a	Plasma	Rat	~800-900	3	12
mi-R208b	Plasma	Pig	1.75	2	---

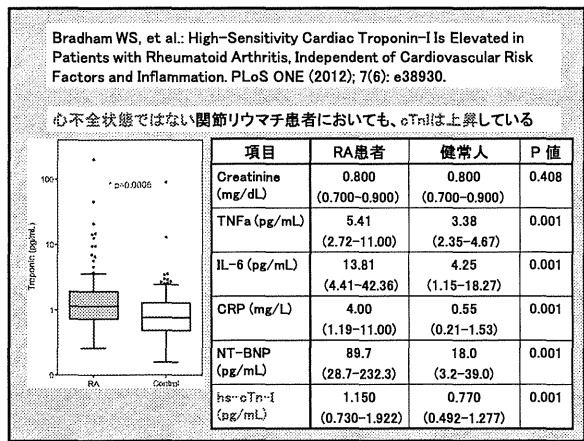
別途、ヒトのデータあり Li C, et al.: *Clin Biochem* (2012); 45: 727-732. <sup>14</sup>

miRNA関連医薬品開発状況

PHARM STAGE (2012); 12 (3): 3-7.  
日本臨床 (2012); 70 (増刊8): 383-387.

開発企業	miRNA	抑制/補充	対象疾患	開発ステージ
Santaris Pharma	miR-122 (miravizsen; SPC3646)	抑制	HCV	P2a
Regulus Therapeutics	miR-122	抑制	HCV	Pre-clinical
	miR-21	抑制	心疾患、がん	Pre-clinical
	miR-34	補充	肝がん	Pre-clinical
	非公開	非公開	免疫・炎症疾患	Pre-clinical
Mirna Therapeutics	Let-7	補充	肺がん	Pre-clinical
	miR-34 (miR-Rx34)	補充	前立腺がん、その他固形がん	Pre-clinical
	(miR-Rx02)	未確認	Non-small cell lung cancer, その他固形がん	Pre-clinical
MiRagen Therapeutics	miR-208/489	抑制	慢性心不全	P1準備
	miR-15/195	抑制	心筋梗塞リモデリング	P1準備
	miR-206	抑制	ALS	Pre-clinical
	miR-29	補充	心臓神経症	Pre-clinical
Groove Biopharma	—	抑制	がん、神経症、感染症	Pre-clinical

15



筋肉領域

厚生労働科学研究費補助金 医薬品・医療機器等シミュレーション・サイエンス総合研究事業  
H22-23年度: 総括研究報告書より抜粋

fatty acid binding protein 3 (Fabp3), miRNA133α, fast-twitch skeletal muscle troponin I (fnTnI)を抽出・解説した。

**H22年度**  
今回調査した筋肉毒性マーカー候補因子は心臓毒性を示す化合物においても変動  
文献情報がまだまだ少ないことから、現段階で筋肉毒性の特異的マーカーとすることは難しい。

**H23年度**  
論文数自体が少ない。miRNA133αも含め、心筋の論文がヒットしてしまう。  
心筋と分離し得るfnTnIについては、2011は1報(PubMed)。

→2012(7月現在)は、fnTnIがヒットしてこない。

17

神経領域

厚生労働科学研究費補助金 医薬品・医療機器等シミュレーション・サイエンス総合研究事業  
H22-23年度: 総括研究報告書より抜粋

SBDP (α-II-Spectrin Break Down Product)、Cleaved-Tau、S100β Protein、Myelin Basic Protein (MBP)、Neuron-Specific Enolase (NSE)を抽出・解説した。

**H22年度**  
動物を用いた系統的な神経毒性バイオマーカー検討は、なされていない。  
S-100BとNSEについては、頭部損傷、虚血、脳卒中について臨床的な研究が多くなされている。  
化学物質の毒性評価におけるバイオマーカーとして、用いられているものはない。

**H23年度**  
S100β Proteinの続報を中心に纏めているが、昨年に比しあまり進展がない(昨年同様、非臨床の知見が非常に少ない)。  
その後、件数としてはS100β Proteinに関する文献が多かった。



レビュー

### Origin of potential biomarkers of cerebral ischemic damage

Damage to neurons	CK-BB, NSE, pNFH, tau, ubiquitin C terminal hydroxylase-L1, brain lipid-binding protein
Damage to glia and reactive gliosis	GFAP, S100B, myelin basic protein
Inflammatory mediators	IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , MMP-9, VCAM-1, etc
Thrombosis markers	D-dimer, thrombin, antithrombin III, von Willebrand factor, etc
Growth factors	PDGF, TGF- $\beta$ , VEGF, etc
Apoptosis markers	Caspase-3

pNFH: phosphorylated axonal neurofilament subunit H  
GFAP: glial fibrillary acidic protein

Seco, M., et al.: Serum biomarkers of neurologic injury in cardiac operations. *Ann Thorac Surg* (2012); 94: 1026-1033. 19

### 最近の検索(神経) S100 $\beta$ を中心として

Egea-Gueereto JJ, et al.: Accuracy of the S100 $\beta$  protein as a marker of brain damage in traumatic brain injury. *Brain Injury* (2012); 26(1): 76-82.

S100 $\beta$ : 外傷性脳損傷後の頭蓋内病巣を検出するために有効なマーカー

Metting Z, et al.: GFAP and S100B in the acute phase of mild traumatic brain injury. *Neurology* (2012); 78: 1428-1433.

軽度脳損傷後の経過予測に対しては、マーカーとも選していない。

Mikkonen K, et al.: S100B proteins in febrile seizures. *Seizure* (2012); 21: 144-146.

S100B: 血液脳関門開口としてのマーカー。乳児/小児の熱性けいれん時にはS100Bが明確には上昇しない。

Lange RT, et al.: Clinical utility of the protein S100B to evaluate traumatic brain injury in the presence of acute alcohol intoxication. *J Head Trauma Rehabil* (2012); 27(2): 123-134.

急性アルコール中毒後の脳損傷: アルコールはS100Bレベルに影響しない。

一方、非臨床の見解は非常に少ない…… 20

Variation of S100B levels in human bodily fluids in distress physiological/pathological conditions

Bodily fluid	Condition
CSF	Perinatal hypoxia and post-hemorrhagic ventricular dilatation, Acute brain injury, Brain tumors, Multiple sclerosis, Neuromyelitis optica, Alzheimer disease, Amyotrophic disease, Amyotrophic lateral sclerosis, Schizophrenia
Blood	Intrauterine growth retard (umbilical blood), Neonatal intraventricular haemorrhage (maternal blood), Acute brain injury, Major cardiac events, Brain metastases, Melanoma, Breast cancer, Multiple sclerosis, Neuromyelitis optica, Alzheimer disease, Amyotrophic lateral sclerosis, Parkinson disease, Schizophrenia, Depressive/bipolar disorders, obesity, Vigorous physical activity, Stressful activity, Prolonged labor (maternal and umbilical blood)
Urine	Asphyxiated fullterm infants, Preterm newborns with intraventricular haemorrhage, Neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy, Early neonatal death, Stressful activity
Saliva	Vigorous physical activity
Amniotic fluid	Intrauterine death, CNS malformations, Trisomy 21, Monoamniotic twin pregnancy
Milk	Milk maturation

Michetti F, et al.: The S100B protein in biological fluids: more than a lifelong biomarker of brain distress. *J Neurochem* (2012); 120: 644-659. 21

### 小児外傷の転帰を予測するマーカー

	Survivors (N=54) Median(min-max)	Non-survivors (N=9) Median(min-max)	P
Age (months)	104.0 (2.0-220.0)	105.0 (8.0-171.0)	0.448
Pediatric Trauma Score	7.5 (3.0-12.0)	5.0 (-2.0-7.0)	0.002
Length of hospitalization (days)	6.0 (1.0-24.0)	5.0 (2.0-14.0)	0.492
S100B (ug/ml)	0.36 (0.04-14.83)	1.60 (0.11-31.24)	0.077
NSE (ng/l)	33.51 (12.51-97.90)	61.84 (25.55-271.30)	0.020
GFAP (ng/ml)	0.12 (0.00-47.65)	7.47 (0.00-46.32)	0.002
Hsp 70 (ng/ml)	0.08 (0.00-15.74)	0.00 (0.00-4.38)	0.658
NF-H (pg/ml)	12.00 (12.00-1442.00)	46.63 (12.00-1482.00)	0.317
Secetagogin (pg/ml)	71.54 (11.00-915.09)	120.42 (11.00-2934.33)	0.463

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* (2012); 154: 93-103. 22

### アミトリプチン誘発心毒性時の血清中S100Bの変化

Experimental groups	Serum S100B protein levels ( $\mu$ g/l)		
	Baseline period	End of the infusion	End of the observation
Control (saline)	0.9 $\pm$ 0.2	1.1 $\pm$ 0.1	1.8 $\pm$ 0.6
A群: 0.625mg/kg/min	0.7 $\pm$ 0.4	1.5 $\pm$ 0.4	2.1 $\pm$ 0.6
B群: 0.94mg/kg/min	1.3 $\pm$ 0.3	1.4 $\pm$ 0.7	2.9 $\pm$ 0.8
C群: 1.25mg/kg/min	0.8 $\pm$ 0.2	0.7 $\pm$ 0.8	5.1 $\pm$ 0.7 #,\$

#,\$ vs Baseline period; End of the infusion (P<0.05)

Hocaoglu N, et al.: *Cardiovasc Toxicol* (2012); 12: 115-122.

薬物infusion後、60分間観察

→B、C群では、QT間隔、QRS時間が増加 23

### MAP-2 (外傷後6ヶ月後の状態と血中濃度との関係)

MAPs (Microtubule-associated proteins) are a major component of cytoskeleton family proteins associated with microtubules, promoting microtubule assembly and stability.

Type I: MAP 1 (1A, 1B)  
Type II: MAP 2, MAP 4, tau  
Others

MAP-2 (樹状突起に発現): 神経の分化・増殖・可塑性マーカー 脳虚血・低酸素血症のマーカー (急性・亜急性)

Serum MAP-2 levels at 6 months in 16 survivors of severe TBI and 16 controls.

	#	MAP-2 (ng/ml)
TBI Survivors 6 months	16	0.06 (0.03-0.09)
Vegetative State	5	0.02 (0.02-0.06)
Minimally Conscious State	4	0.07 (0.05-0.08)
Patients emerging from MCS	7	0.1 (0.06-0.11)
Controls	16	0.03 (0.02-0.04)

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* (2012); 26(13-14): 1629-1635. 24

Chabok, SY., et al: Neuron-specific enolase and S100BB as outcome predictors in severe diffuse axonal injury. J Trauma Acute Care Surg (2012); 72(6): 1654-1657.

Diffuse axonal injury:びまん性軸索損傷

S100B:2つのアイソフォーム(S100A1B, S100Bβ)があり、S100BBは脳において主要なモノマー

Stein, DM, et al.: Use of serum biomarkers to predict cerebral hypoxia after severe traumatic brain injury. J Neurotrauma (2012), 29, 1140-1149.

脳損傷後の脳虚血とマーカー値:相関性はS100B>NSE>GFAPの順

Tavarez, MM, et al.: Acute evaluation of pediatric patients with minor traumatic brain injury. Current opinion in pediatrics (2012); 24(3): 307-313.

軽度外傷性脳損傷(2歳以下):CTまで実施する必要なく、S100Bで診断することが可能な場合がある。CTまで必要か否か、フローチャートあり。

Glushakova, OY, et al.: Cerebrospinal fluid protein biomarker panel for assessment of neurotoxicity induced by kainic acid in rats. Toxicol Sci (2012); 130(1), 158-167.

ラットに kainic acid 9mg/kg, s.c.(単回)→経時採血 (~24hr)

SBDP120, 145, 150, GFAP, UCH-L1 (ubiquitin C-terminal hydrolase-1)の上昇を確認

Wu, JC et al.: Location and level of Etk expression in neurons are associated with severity of traumatic brain injury. PLoS One (2012); 7(6): e39226.

ラット:外傷モデル(開頭後、電気刺激)

25

20130207  
ICH総会講 1

## 毒性・副作用バイオマーカー(BM) に関する調査

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

医薬品の品質、有効性及び安全性確保のための規制の国際調和の推進に  
関わる研究

研究協力  
製薬協 基礎研究部会  
一般毒性課題対応チーム

20130207  
ICH総会講 2

## 毒性・副作用バイオマーカー(BM)の 現状と問題点

血中BM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トランスレーションすることができる。

現状では、重要な毒性の発現と関連する、適切な予測的血中BM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BMは存在しない。

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。

Tarrant JM., Toxicol. Sci. (2010) 117:4-16

20130207  
ICH総会講 3

## 調査方法

調査領域1: 肝障害・脂肪化, 肺炎・血管炎, 精巣毒性  
調査方法: 2011年調査結果のアップデート

調査領域2: 骨毒性, 消化管毒性  
調査方法: 過去5年を目安とした総説・論文

内容: 現状と問題点, 最近使われている技術,  
新しいマーカー(項目, マーカーとなる理由, 測定系など),  
今後の展望と課題

研究協力者: 田口和彦(ブリistol・マイヤース), 本山径子(ヤンセンファーマ),  
荻野大和(トアエコー), 下元貴澄(帝人ファーマ),  
戸和秀一(田辺三菱), 韓大健(日本イライリ),  
友廣雅之(日本アルコン), 佐々木正治(アウイ), 小林章男(JT),  
鈴木睦(協和発酵キリン)

20130207  
ICH総会講 4

## 毒性・副作用バイオマーカー (薬剤性肝障害, 肝脂肪化: アップデート)

20130207  
ICH総会講 5

## 新しいバイオマーカー候補 (薬剤性肝障害, 肝脂肪化)

- 2011年調査の血中BM:  
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), IL-1b,  
IL-6, IL-8, IL-10, TNFα receptor1, CRP, Vaspin, PTX3, SPEA,  
CK18, miRNA-122・192
- 2012年追加 臨床・非臨床とも:  
Metabolomics, Proteomicsによる血中BM探索  
⇒ リン脂質類(多項目), ビルビン酸, クレアチニン, クレアチン,  
GSH関連アミノ酸

➢ 2012年 肝障害BM探索の論文多い  
➢ 適格性が確認できた新規毒性・副作用BMの報告なし

20130207  
ICH総会講 6

## 毒性・副作用バイオマーカー (炎症 - 血管炎・肺炎: アップデート)

20130207  
ICH総会議  
7

**新しいバイオマーカー候補  
(炎症 - 血管炎・肺炎)**

- 2011年調査の血中・肺胞洗浄液中BM:  
IL-8, IL-10, MCP-1, Pentoraxin 3, ANCA, Procalcitonin,  
TREM-1, Endotoxin, Copeptin, CRP, Cortisol, MR-proANP
- 2012年追加 臨床・非臨床とも:  
肺炎: 8-oxodeoxyguanosine, D-dimers, BNP  
血管炎: Adrenomedullin, IL-8など内皮細胞活性化因子

➢2012年 Procalcitoninの検証などBM探索の報告あり  
➢適格性が確認できた新規毒性・副作用BMの報告なし

20130207  
ICH総会議  
8

**毒性・副作用バイオマーカー  
(精巣毒性:アップデート)**

20130207  
ICH総会議  
9

**新しいバイオマーカー候補  
(精巣毒性)**

- 2011年調査の血中・精巣中・精液中BM:  
Testosterone, LH, FSH, Inhibin B, Creatin, FABP9,  
Calpastatin, HSP 70-2, Glyceraldehyde 3-phosphate  
dehydrogenase, Phosphatidylethanolamine-binding protein,  
GST, miRNA-92a,134,188-5p,320,449a
- 2012年追加:miRNA及びイメージング  
精巣中miRNAの変動報告<sup>a)</sup>があったため、尿・血液中の報告  
を調査したが、PubMed, EMBASEによる検索でヒットなし。  
a) Fukushima T *et al*, J. Toxicol. Sci., (2011),601-611

➢2012年 尿中・血中miRNA及びイメージングの報告なし

20130207  
ICH総会議  
10

**毒性・副作用バイオマーカー  
(骨、2012年度調査)**

20130207  
ICH総会議  
11

**新しいバイオマーカー候補  
(骨、2012年度調査)**

- 尿中・血中BM: 臨床・非臨床とも

骨代謝マーカー	項目(保険点数あり)
骨形成マーカー (骨芽細胞機能を評価)	オステオカルシン, 骨型アルカリフォスファターゼ, I型プロコラーゲン-N-プロペプチド(PINP)
骨吸収マーカー (破骨細胞機能を評価)	ピリジノリン(PYD), デオキシピリジノリン(DPD), I型コラーゲン架橋N-テロペプチド(NTX), I型コラーゲン架橋C-テロペプチド(CTX), 酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ-5b(TRACP-5b)

保険点数あり=臨床的意義あり  
その他の尿中または血中BM: オステオポンチン,オステオプロテジェリン,  
破骨細胞分化因子RANKL, miRNA-133a

➢骨粗鬆症治療での使用実績が豊富  
➢毒性・副作用BMとしての使用報告はなかったが、非臨床  
でも測定できる項目があり、有効なBMとして期待できる

20130207  
ICH総会議  
12

**毒性・副作用バイオマーカー  
(消化管毒性、2012年度調査)**