

Biochemistry: National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines: Clinical characteristics and utilization of biochemical markers in acute coronary syndromes. *Circulation*, 115: e356-375, 2007.

- 6) 日本循環器学会:慢性心不全治療ガイドライン (2010年改訂版)、循環器病の診断と治療に関するガイドライン (2010年度合同研究班報告) 慢性心不全治療ガイドライン 2010年改訂版
- 7) 特集 循環器病のバイオマーカー、3. 各種バイオマーカーの循環器疾患における意義、O. 心筋トロポニン、豊田茂、*Heart View*, 16 (12, 増刊号), 2012.
- 8) 大倉ひろ枝 他、*臨床病理* 61: 375-381, 2013.
- 9) Apple F. S., et al., Analytical characteristics of commercial cardiac troponin I and T immunoassays in serum from rats, dogs, and monkeys with induced acute myocardial injury. *Clin. Chem.*, Dec; 54(12): 1982-1989, 2008.
- 10) Tonomura Y., 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*, Dec 16; 302(2-3): 179-189, 2012.
- 11) Minomo H., et al., Characteristics of troponins as myocardial damage biomarkers in cynomolgus monkeys. *J. Toxicol. Sci.*, Dec; 34(6):589-601, 2009.
- 12) O'Brien P. J., Cardiac troponin is the most effective translational safety biomarker for myocardial injury in cardiotoxicity. *Toxicology*, Mar 20; 245(3): 206-218, 2008.

## C-2: 心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP)、脳性ナトリウム利尿ペプチド (BNP)、脳性ナトリウム利尿ペプチド前駆体N端フラグメント (NT-pro BNP)

### 1. 歴史・由来

世界中の研究グループが心臓の利尿作用物質につ

いて探索する中、1984年に日本の研究者によってヒト心臓の心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP) の分子構造が報告された<sup>1), 2)</sup>。また、同研究者によるブタの脳を使った脳内新規ペプチドを探す研究の一環の中で、1988年、脳性ナトリウム利尿ペプチド (BNP) の構造が報告された<sup>1), 2)</sup>。NT-proBNP (脳性ナトリウム利尿ペプチド前駆体N端フラグメント) は、BNPと同じ前駆体から生じるペプチドである<sup>3)</sup>。

### 2. 生理学的特徴

ANPは主に心房、BNPは主に心室で合成され、血中を循環しているANP及びBNPはほぼ100%心臓由来である<sup>4)</sup>。ANPは心房の伸展刺激 (心房圧による心房筋の伸展) によって分泌が亢進するとされている<sup>4)</sup>。BNPは心筋細胞の壁応力の増加とともに分泌が亢進するため、血行動態の異常、左室拡張末期圧の上昇、心拍出量の低下に比例して上昇するとされている<sup>3)</sup>。ANP及びBNPはナトリウム利尿ペプチド受容体A (NPR-A) に特異的に結合し、サイクリックGMPの産生を介して種々の作用を発揮する<sup>3)</sup>。NPR-Cはクリアランス受容体としてANP及びBNPの代謝に関与し、腎近位尿細管、中枢神経系や内皮細胞に存在する中性エンドペプチダーゼにおいてもANP及びBNPは代謝される<sup>3)</sup>。また、ANP及びBNPは、利尿をはじめ様々な作用を有しており、心不全治療薬として臨床応用されている<sup>2)</sup>。一方、生理活性のないNT-proBNPは、心筋細胞に対するメカニカルストレス (左室拡張期圧上昇、左室拡張期容積増大、左室肥大、壁運動異常、心筋虚血) により生合成が亢進したBNP前駆体から、生理活性を有するBNPとともに生じる<sup>3), 4)</sup>。NT-proBNPは、BNPと比べて心不全の重症度に応じて、より急峻に上昇するとされている<sup>4)</sup>。また、NT-proBNPは、主に腎臓でのみ分解されクリアランスされるため、BNPと比べて腎機能の影響を受けやすいと考えられており<sup>4)</sup>、心機能だけではなく予後の重要な規定因子である腎機能障害を併せて評価しているため、リスク評価にはBNPより優れている可能性が推察されている<sup>3)</sup>。

### 3. 臨床における使用の特徴 - 診断マーカーとして -

ANPが高値の場合、心房負荷や循環血漿量の増加を起こす病態が存在することを意味しており、ANP血中濃度は心不全の重症度が上がるとともに上昇するとされている<sup>4)</sup>。その他、腎不全などの重症度や治療効果を判定するときにもANPの測定が行われ、高血圧の病態把握、内分泌疾患のスクリーニングなどにも利用されている。BNPはANPより左室拡張末期圧と正の相関があり、左室拡張末期圧が増加するにつれて上昇する<sup>4)</sup>。心不全の重症度に伴う血中濃度上昇の程度は、ANPよりもBNPで大きく、日本では、BNPが心不全のバイオマーカーとしてよく利用されている<sup>4)</sup>。また、BNPは、心室機能の把握、心不全あるいは心肥大の治療効果の確認、抗腫瘍薬あるいは向精神薬による心筋障害の早期感知にも利用されている。一方、欧米ではBNPに加えてNT-proBNPの測定系もよく利用されており、心不全の診断・重症度評価、予後予測にBNPと同等の有効性が報告されている<sup>4)</sup>。

### 4. 測定方法

臨床でのANP、BNP及びNT-proBNPのペプチド測定は保険が適用されており、ANPではEIA（酵素免疫測定）法及びCLEIA（化学発光酵素免疫測定）法、BNPではFIA（蛍光免疫測定）法及びCLEIA法、NT-proBNPではEIA法及びECLIA（電気化学発光免疫測定）法などが知られている。また、非臨床では、ANPのペプチド測定としてCLEIA法<sup>5)</sup>、RIA（放射免疫測定）法<sup>6), 7)</sup>及びIRMA（免疫放射定量測定）法<sup>8)</sup>など、ANPのmRNA測定としてRT-PCR法<sup>9), 10)</sup>など、BNPのペプチド測定としてRIA法<sup>6), 7), 8)</sup>及びEIA法<sup>11)</sup>など、BNPのmRNA測定としてRT-PCR法<sup>10)</sup>など、NT-proBNPのペプチド測定としてEIA法<sup>5), 6)</sup>などが報告されている。

### 5. 非臨床への応用／種差

哺乳類ANPのアミノ酸配列はよく保存されており、12番目のアミノ酸がヒトではMetであるのに対してげっ歯類ではIleと1つのアミノ酸が異なるだけであるが、哺乳類BNPはBNP predominant circulating

formのアミノ酸数に種差がある（ブタ26個、ラット45個、ヒト32個）ことが知られている<sup>12)</sup>。

### 6. 非臨床への応用／薬剤応答性

非臨床でのANP、BNP及びNT-proBNP測定に関して文献調査を実施した結果、ANPについては、心房細動モデル（イヌ）<sup>6)</sup>、心臓への急性容量負荷（イヌ）<sup>5)</sup>、拡張型心筋症（サル）<sup>13)</sup>、心房ペースティングモデル（ブタ）<sup>7), 8)</sup>、Isoproterenol（ISO）誘発心肥大モデル（ラット）<sup>9)</sup>及び心不全誘発TGマウス<sup>10)</sup>などで、血中濃度の上昇または心筋組織中mRNAの増加が認められていた。薬剤応答性としての情報としては、ISO 5 mg/kgを14日間連日皮下投与して心肥大を誘発したラットが、対照群動物と比較して数倍の心筋組織中mRNA量を示していた<sup>9)</sup>。

また、BNPについては、心房細動モデル（イヌ）<sup>6)</sup>、ペースティング負荷心不全モデル（サル）<sup>14)</sup>、拡張型心筋症（サル）<sup>13)</sup>、心房ペースティングモデル（ブタ）<sup>7), 8)</sup>、Daunorubicin（DAU）投与心不全モデル（モルモット）<sup>11)</sup>及び心不全誘発TGマウス<sup>10)</sup>などで、血中濃度の上昇または心筋組織中mRNAの増加が認められていた。薬剤応答性としての情報としては、DAU 3 mg/kg週1回10週間反復腹腔内投与によって心不全を生じたモルモットが、対照動物と比較して血中濃度の高値を示していた<sup>11)</sup>。

### 7. 非臨床への応用／予見性・回復性

ANPについては、ブタ24時間心房ペースティングモデルにおいて、処置後15分より24時間の処置が終了するまで血中濃度の高値（プレ値と比較して数倍に達する）が認められ、処置終了後にはプレ値に近い低値を示していたこと<sup>8)</sup>などから、心房への負荷がなくなればその変動も収まる可能性が考えられた。

また、BNPについては、ブタ24時間心房ペースティングモデルにおいて、処置後15分より24時間の処置が終了するまで血中濃度の上昇（プレ値と比較して数倍に達する）が認められ、処置終了後にはプレ値に近い低値を示していたこと<sup>8)</sup>などから、心臓への負荷がなくなればその変動も収まる可能性が考えられた。

また、NT-proBNPについては、心房細動モデル（イヌ）<sup>6)</sup>、心不全モデル（イヌ）<sup>6)</sup>及び心臓への急性容量負荷（イヌ）<sup>5)</sup>などで、血中濃度の上昇が認められており、イヌ心臓急性容量負荷モデル（リングル液を持続点滴投与）において、急性容量負荷後の血中濃度が、プレ値と比較して一過性に数倍上昇したこと<sup>5)</sup>などから、心室への負荷がなくなればその変動も収まる可能性が考えられた。

#### 8. 非臨床への応用／病理との相関

ANP、BNP及びNT-proBNPの変動と心臓の病理組織学的変化との相関を詳細に検討した報告はなかった。

#### 9. 臨床／非臨床の相関性（定性的／定量的）

ANP、BNP及びNT-proBNPについては、臨床と同様に非臨床でもペプチド測定用キットが販売されており、臨床及び非臨床ともに定量評価が可能である。老年者軽症心不全患者の血中ANP濃度情報<sup>15)</sup>、ヨーロッパ心臓病学会ガイドライン及び前述の非臨床文献情報<sup>8)</sup>などから、ANPについては、臨床及び非臨床ともに、病態では数倍程度の変動（血中濃度上昇）を示す可能性が考えられた。また、BNPについては、臨床病態（心不全）で約20倍以上、非臨床病態で数倍以上の変動（血中濃度上昇）を示す可能性、NT-proBNPについては臨床病態（心不全）で約35倍以上、非臨床病態では数倍以上の変動（血中濃度上昇）を示す可能性が考えられた。

#### 10. ガイドライン

BNP及びNT-proBNPは、日本循環器学会、ヨーロッパ心臓病学会で心不全の診断・重症度評価・治療効果判定に推奨されているバイオマーカーである<sup>4)</sup>。

#### 11. まとめ

ANP、BNP及びNT-proBNPについては、個人差も含めて生理的機能の背景値内での変動が通常にみとめられることがあることから、単一のマーカーの変動のみで病態や安全性への影響を評価することは困難である可能性が高い。しかしながら、これらのマ

ーカーの変動が心臓への障害を示しているエビデンスは積み重ねられており、医薬品開発における安全性バイオマーカーとしても、他のバイオマーカーと組み合わせることにより、非臨床試験の心機能に及ぼす機能毒性を評価できる可能性が示唆された。

#### 12. 参考文献

- 1) ナトリウム利尿ペプチドファミリーの発見 寒川賢治先生に聞く. 心臓, 42(1): 105-120 (2010)
- 2) 水野雄二: ANP、BNP 日本が誇る世界をリードしてきたテーマ. *Medicina*, 50(7): 1131 (2013)
- 3) 石井潤一: 虚血性心疾患の心筋ストレスマーカー (BNP、ANP、NT-proBNP). *生物試料分析*, 32(2): 135-144 (2009)
- 4) 小林茂樹ら: 心不全 総論 バイオマーカー. *診断と治療*, 100(9): 1461-1469 (2012)
- 5) Hori Y et al: Acute cardiac volume load-related changes in plasma atrial natriuretic peptide and N-terminal pro-B-type natriuretic peptide concentrations in healthy dogs. *Vet. J.*, 185(3): 317-321 (2010)
- 6) Urban JF et al: Methods for the development and assessment of atrial fibrillation and heart failure dog models. *J. Geriatr. Cardiol.*, 8(3): 133-140 (2011)
- 7) Klinge R et al: An experimental study of cardiac natriuretic peptides as markers of development of congestive heart failure. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 58(8): 683-691 (1998)
- 8) Qi W et al: Differential responses of plasma atrial and brain natriuretic peptides to acute alteration in atrial pressure in pigs. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 60(1): 55-63 (2000)
- 9) Chowdhury D et al: A proteomic view of isoproterenol induced cardiac hypertrophy: Prohibitin identified as a potential biomarker in rats. *J. Transl. Med.*, 11: 1-13 (2013)
- 10) 弘瀬雅教ら: 慢性心不全に対するニコランジルの改善作用メカニズム -心不全誘発モデルマウスを用いた検討-. *Ther. Res.*, 32(3): 262-264 (2011)

- 11) Manna F et al: Effect of cardiac glycosides isolated from the fermented extract of the seeds of *Corchorus olitorius* and *Corchorus capsularis* against daunorubicin-induced congestive heart failure. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 104: 175-180 (2008)
- 12) Nakao K et al: Molecular biology and biochemistry of the natriuretic peptide system. I: Natriuretic peptides. *J. Hyper.*, 10(9): 907-912 (1992)
- 13) 揚山直英ら: 霊長類拡張型心筋症モデルにおける基礎および臨床学的解析. 第143回日本獣医学会学術集会講演要旨集, 228 (2007)
- 14) Ebisawa T et al: Establishment of induced heart failure model in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Exp. Anim.* 57(3): 254 (2008)
- 15) 上田清悟ら: 老年者心不全の長期予後. *日本老年医学会雑誌*, 33(5): 340-345 (1996)

### C-3: 心臓型脂肪酸結合蛋白 (H-FABP)

#### 1. 歴史・由来

心筋に存在するH-FABPは、心筋傷害を受けた際に血流中に出現し、また、他臓器のFABPと識別可能なため、鋭敏な心筋傷害マーカーとして注目される<sup>1), 2), 3)</sup>。心筋梗塞 (MI) 診断のための生化学マーカーとして、酵素免疫測定法 (ELISA) を測定原理とする血中H-FABP測定用試薬が市販された (1999年)。その後、心筋が傷害を受けた際、早期から血中に出現するため、急性心筋梗塞 (AMI) の診断に有用なバイオマーカーの1つとして注目され、緊急検査に適した免疫クロマトグラフィーを測定原理とする血中H-FABP測定用試薬が市販されている (2002年)。

#### 2. 生理学的特徴

脂肪酸結合蛋白 (FABP) は、脂肪酸の細胞内輸送に携わる低分子量蛋白で、脂肪酸代謝の活発な臓器の細胞質に豊富に存在する。心筋は収縮エネルギーを主に長鎖脂肪酸 $\beta$ 酸化に依存するため、FABP含有量が特に豊富である<sup>4)</sup>。FABPは臓器により異なった分子種が発現しており、心臓型 (H-FABP)、肝臓型

(L-FABP)、小腸型 (I-FABP) が知られているが、免疫学的に識別可能である。H-FABPは、主に心筋細胞の細胞質に存在する分子量約15kDaの低分子可溶性蛋白である。心筋以外の骨格筋にも存在するが、心筋には骨格筋の5~20倍量存在し、心筋特異性が高い<sup>5), 6), 7)</sup>。

#### 3. 臨床における使用の特徴 - 診断マーカーとして -

H-FABPは、心臓虚血による心臓細胞の傷害時に速やかに血中へ逸脱するため、急性心筋梗塞 (AMI) の早期診断マーカーとして臨床使用されている。一般に、AMI発症後6時間以内の診断、特に発症後3時間以内で有用とされる<sup>8)</sup>。H-FABPは心筋傷害の発症早期から血中に出現することから、積極的な治療方針の決定が必要とされる急性冠動脈症候群の診断にも有用とされる。

#### 4. 測定方法

測定方法は、ELISA法、免疫クロマト法、ラテックス免疫比濁法またはラテックス凝集法がある。

#### 5. 非臨床への応用/種差

げっ歯類 (マウス・ラット) での使用実績がある。イヌ<sup>9)</sup>、サル<sup>10)</sup> での報告もある。測定原理に種差はないが、げっ歯類用の測定キットが存在する。

#### 6. 非臨床への応用/薬剤応答性

事例として、*Isoproterenol*誘発心筋傷害モデルラット<sup>11), 12)</sup> における報告がある。

#### 7. 非臨床への応用/予見性・回復性

H-FABP値の上昇と薬物の用量との間に相関性がみられる<sup>11)</sup>。単回投与後のH-FABPは一過性に上昇し、病理スコアはH-FABP値が低下した後も上昇することから、回復性は確認できない可能性がある。

#### 8. 非臨床への応用/病理との相関

心筋傷害の病理組織学的スコアとH-FABP値との相関性がある。また、心筋壊死が生じる前にH-FABPの上昇が始まる<sup>11)</sup>。

## 9. 臨床／非臨床の相関性（定性的／定量的）

心毒性を示す薬剤を用いた検討でH-FABPの上昇が心臓傷害に対しある程度の用量反応性を示す事例がある<sup>11)</sup>が、事例が少なく、詳細には定量性が検討されていない。今後、非臨床において心筋傷害性との関連性を詳細に解析する必要がある。

## 10. ガイドライン

AMI（ST上昇型）の診療に関するガイドラインにおいて、初期評価項目チェックリスト中の心筋傷害マーカーの1つとしてH-FABPがある。

## 11. まとめ

臨床においては、測定・使用法は確立しており、早期のAMI、急性冠動脈症候群（ACS）の診断のバイオマーカーの1つである。問診及び身体検査との組合せで感度が上がることから、診断確実性の増加を提供できる。非臨床においては、マウス、ラット、イヌ、ミニブタでの報告がある。H-FABP測定値と心筋傷害の病理組織学的所見との相関性を示す事例があるが、詳細には定量性を検討されていない。今後、非臨床において心筋傷害性変化との関連性を詳細に解析する必要があるが、薬剤誘発性の急性心筋傷害スクリーニングでのマーカーを示唆し、また、他のマーカーと組み合わせて、非臨床・臨床の共通マーカーとして利用することが可能になることが期待される。

## 12. 参考文献

- 1) Tanaka T, Hirota Y, Sohmiya K, Nishimura S, Kawamura K : Serum and urinary human heart fatty acid-binding protein in acute myocardial infarction. Clin Biochem 24:195-201, 1991
- 2) Tsuji R, Tanaka T, Sohmiya K, et al : Human heart-type cytoplasmic fatty acid-binding protein in serum and urine during hyper acute myocardial infarction. Int. J. Cardiol 41:209-217, 1993
- 3) Kleine AH, Glatz JFC, Van Nieuwenhoven FA, Van der Vusse GL : Release kinetics of heart-type fatty acid-binding protein into plasma after acute myocardial infarction in man. Mol Cell Biochem 116:155-162, 1992
- 4) Schaap FG, Vusse GJ, Glatz JFC, et al: Fatty acid-binding proteins in the heart, Mol cell Biochem 180: 43-51, 1998.
- 5) Tanaka t, Hirota Y, Sohmiya K, Nishimura S, Kawamura K: Serum and urinary human heart fatty acid-binding protein in acute myocardial infraction. Clin Biochem 24: 195-201, 1991
- 6) Tsuji R, Tanaka T, Sohmiya K, et al: Human heart-type cytoplasmic fatty acid-binding protein in serum and urine during hyperacute myocardial infarction. Int. J. Cardiol 41: 209-217, 1993.
- 7) Kleine AH, Glatz JFC, Van Nieuwenhoven FA, Van der Vusse GJ: Release kinetics of heart-type fatty acid-binding protein into plasma after acute myocardial infarction in man. Mol Cell Biochem 116: 155-162, 1992.
- 8) Seino Y, et al: Use of a whole blood rapid panel test for heart-type fatty acid-binding protein in patients with acute chest pain: Comparison with rapid troponin T and myoglobin tests, Am J Med, 115: 185-190, 2003
- 9) Strauss V, Wöhrmann T, Frank I, Hübel U, Luft J, Bode G, Germann PG : Short-term increase of serum troponin I and serum heart-type fatty acid-binding protein (H-FABP) in dogs following administration of formoterol. Exp Toxicol Pathol. 62(4):343-52, 2010
- 10) Minomo H, Torikai Y, Furukawa T, Uchino H, Kadokura H, Nakama K, Maeda H, Kamenosono T, Sukamoto T, Fukuzaki K, Nagata R: Characteristics of troponins as myocardial damage biomarkers in cynomolgus monkeys. J. Toxicol. Sci. 34(6):589-601, 2009
- 11) Hasić S, Jadrić R, Cosović E, Kiseljaković E, Mornjaković Z, Winterhalter-Jadrić M : Heart-type fatty acid-binding protein and its relation with morphological changes in rat myocardial damage model induced by isoproterenol. Bosn J Basic Med

Sci. Nov;11(4):240-4, 2011

- 12) Clements P, Brady S, York M, Berridge B, Mikaelian I, Nicklaus R, Gandhi M, Roman I, Stamp C, Davies D, McGill P, Williams T, Pettit S, Walker D: Time course characterization of serum cardiac troponins, heart fatty acid-binding protein, and morphologic findings with isoproterenol-induced myocardial injury in the rat. *Toxicol Pathol.* 38(5):703-14, 2010

#### C-4 : miRNA

##### 1. 歴史・由来

Micro RNA (miRNA) に関する論文は近年増加しており、研究が盛んな領域である。多くの種類が報告されている。本調査では近年のmiRNAの総説を基に、特異性が高く特に報告が多いmiRNA-1、miRNA-133、miRNA-208a/b、miRNA-499を対象とした。

miRNA研究の歴史は、1993年のLeeらの線虫における発見が端緒となった<sup>1)</sup>。miRNAは、mRNAに結合して翻訳を阻害する小さなRNAとして、哺乳類を含めた他の生物にも存在が確認されている<sup>2)</sup>。miRNAという用語は、2001年のScienceの掲載論文によって定義され<sup>3)</sup>、2008年にはChim、Giladらにより血中miRNAの存在が報告されている<sup>4), 5)</sup>。

##### 2. 生理学的特徴

miRNAは、18から25塩基程度のノンコーディングRNA<sup>6)</sup>であり、主に他の遺伝子の転写後制御に関与している。また、標的側の結合部位との完全一致を必要とせず、一つのmiRNAが平均200個のmRNAに関与しているとの報告<sup>7)</sup>もあり、遺伝子の1/3~1/2はmiRNAの制御下にあると考えられている。なお、一般的に細胞外のmiRNAは、エキソソームに内包されて存在していることから血中でも安定とされている。

##### 3. 臨床における使用の特徴 - 診断マーカーとして -

臨床においては、バイオマーカーとして診断に使用するより、治療薬（特になん領域）として疾患特

異的に発現亢進しているmiRNAの機能を抑制することを目的とした研究が進められている。その他、発現が低下したmiRNAを補充する療法などが研究されている。診断・治療モニターとしての利用としては、がんの診断キット（組織）が海外で販売されているが、一般には普及していない。心臓に関するmiRNAは、心筋壊死性変化の診断マーカーとして多施設で報告されており、従来のマーカーと比較して、高感度かつ障害早期に反応するという報告もある。miRNA-1では、AMIの症例で高値を示し、CK-MBとも相関する報告がある<sup>8)</sup>。miRNA-208では、健常ボランティアでは検出がなく、疾患特異性が高いとの報告があるが、高値となった症例は全て死亡転帰しており、予測マーカーとしての期待は薄い。miRNA-499では、他のmiRNAやTroponin-Iよりも血中への放出が遅いとの報告がある<sup>9)</sup>。

##### 4. 測定方法

miRNAはノーザンハイブリダイゼーション法及びマイクロアレイ法により測定されることもあるが、最近の主流は、採血した血液中のmiRNAをリアルタイムPCR法により増幅して測定する方法である。血中で安定であるためmiRNAの取扱いは容易であり、臨床と非臨床で測定方法に差がないことが利点であるが、測定結果の取得まで数時間を要し、迅速検査の点では問題がある。

##### 5. 非臨床への応用／種差

非臨床においては、miRNA-1のモデル動物による評価として、ラット、LAD (Left Anterior Descending artery) 結紮モデルにおける心筋壊死の範囲との相関や、ラット・マウス心臓虚血再灌流モデルにおける病理組織学的検査 (TUNEL染色) で評価した傷害領域との相関等の報告<sup>10)</sup>がある。検出のタイミングについては、ラット心筋虚血の1時間後から上昇する<sup>11)</sup>。

##### 6. 非臨床への応用／薬剤応答性

既知の心臓障害性薬剤の投与や心筋障害モデルで有意に上昇を認める等の報告がある。miRNA-133a

では、非臨床急性心筋梗塞モデルや冠状動脈血栓モデルなどのモデル動物での報告、三酸化二ヒ素によるQT延長との相関性が報告されているが、骨格筋にも存在することから特異性は低い可能性がある。miRNA-208では、非臨床急性心筋梗塞モデルや冠状動脈血栓モデルでの報告のほか、イソプロテレノール誘導の心筋壊死やDoxycyclineによるフリーラジカル性心筋壊死との相関を示唆する報告があり、心筋特異的な非臨床マーカーとして期待できる。miRNA-499では、動物を扱った文献が少なく、ほとんどが組織から抽出したmiRNAを評価しており、更なる研究が必要と考えられる。

#### 7. 臨床／非臨床の相関性（定性的／定量的）

ヒトへの外挿性の面では、共通するmiRNAは数多く報告<sup>8)</sup>されており、結合部位が若干異なるがヒトへの外挿性は高いと考えられる。動物間の種差については、心筋特異的なmiRNAとしてカニクイザル、Wistarラット、ビーグル犬に共通するmiRNAが7種（miRNA-1、miRNA-133a/b、miRNA-208-b、miRNA-30e、miRNA-499-5p、miRNA-30e）報告<sup>12)</sup>されている。ヒトを用いた検討は多いが、非臨床心毒性のバイオマーカーとしての応用例が少なく、定性的なスクリーニング評価が多い。今後、非臨床における更なる検討が必要である。

#### 8. まとめ

miRNAには種間で共通する種類も多く、臓器特異性と検体取扱いの容易さからバイオマーカーとしての有用性には期待が持たれる。ただし、測定方法の難易度や個体差など引き続き検討されるべき課題も多い。現時点において臨床及び非臨床ともにバイオマーカーとしてバリデートされたわけではなく、研究レベルでの報告が主体となっている。miRNAは外挿性の高いマーカーとなりえる可能性を有していると考えられることから、有望なバイオマーカーとして今後の検討が期待される。

#### 9. 参考文献

1) Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans*

heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993 Dec 3;75(5):843-54.

- 2) Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, et al. Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature*. 2000 Nov 2;408(6808):86-9.
- 3) Ruvkun G. Glimpses of a Tiny RNA World. *Science*. 2001 294:797-799
- 4) Chim SS, Shing TK, Hung EC, Leung TY, Lau TK, Chiu RW, Lo YM. Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma. *Clin Chem*. 2008 54(3):482-90.
- 5) Gilad S, Meiri E, Yogeve Y, et al. Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS One*. 2008 3(9):e3148
- 6) Stefani G, Slack FJ. Small non-coding RNAs in animal development. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 Mar;9(3):219-30.
- 7) Didiano D, Hobert O. Perfect seed pairing is not a generally reliable predictor for miRNA-target interactions. *Nat Struct Mol Biol*. 2006 Sep;13(9):849-51.
- 8) Cheng Y, Tan N, Yang J, Liu X, Cao X, He P, et al. A translational study of circulating cell-free microRNA-1 in acute myocardial infarction. *Clin Sci (Lond)*. 2010 Jul;119(2):87-95.
- 9) Creemers EE, Tijssen AJ, Pinto YM. Circulating microRNAs: novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease? *Circ Res*. 2012 Feb 3;110(3):483-95.
- 10) Pan Z, Sun X, Ren J, Li X, Gao X, Lu C, et al. miR-1 exacerbates cardiac ischemia-reperfusion injury in mouse models. *PLoS One*. 2012;7(11):e50515.
- 11) Xu J, Zhao J, Evan G, Xiao C, Cheng Y, Xiao J. Circulating microRNAs: novel biomarkers for cardiovascular diseases. *J Mol Med (Berl)*. 2012 Aug;90(8):865-75.

12) Vacchi-Suzzi C, Hahne F, Scheubel P, Marcellin M, Dubost V, Westphal M, et al. Heart structure-specific transcriptomic atlas reveals conserved microRNA-mRNA interactions. PLoS One. 2013;8(1):e52442.

## C-5 : イメージング

### C-5-1 : PET

#### 1. 歴史・由来

Positron Emission Tomography (PET) の研究開発の歴史は1960年代に遡るが、臨床の場で広く使われるようになったのは1990年後半と言われている。PETを行うためには、短半減期のポジトロン核種で標識したトレーサーが必要であり、これを作製するためのサイクロトロンを必要とすることから、医療現場への普及は診断効果が顕著な2-deoxy-2-(18F)fluoro-D-glucose(FDG)の出現を待たなければならなかった。今後、ゲノム、分子生物学の成果を取り入れた分子イメージングの進歩が期待されており、PETの臨床・非臨床での応用はさらに拡大が見込まれている。

#### 2. 生理学的特徴

PET装置は体内に投与されたPET薬剤から放出されるガンマ線を検出し、画像化する技術である。PET薬剤の体内分布は、PET薬剤及び生物の生理学的特徴によって変動する。例えば、FDGはブドウ糖の摂取量が多い細胞に蓄積することから、ブドウ糖の取り込みが盛んな悪性度の高い癌ではFDGの取り込み量が多くなる。このような生理学的特徴から、FDGをPET薬剤として用いることにより癌の悪性度や進行度(ステージング)を推定することも可能となっている。以上のように、PETにより、ヒト及び動物の生理的機能を検討することができると考えられている。

#### 3. 臨床における使用の特徴 - 診断マーカーとして -

CTやMRIは、相対的に臓器の静的な状態を形で判断するが、PETは、主に細胞の機能的な状態を反映するという特徴を有する。Cardiology領域では、血管

の炎症性プラークイメージングや心筋viability判別への応用が可能と考えられる。また、心筋の血流や糖代謝を検査できることが知られている。

参考資料：フィリップスエレクトロニクスジャパンHP、

[http://www.innervision.co.jp/ad/suite/philips/technical\\_notes/130438](http://www.innervision.co.jp/ad/suite/philips/technical_notes/130438)

#### 4. 測定方法<sup>1), 2)</sup>

ラットの栄養状態を揃えるため、検査前10時間前後から絶食し、イソフルランなどで導入及び維持麻酔をして検査を行う。FDGなどの放射性同位元素標識したPET試薬を静脈内投与して、PETで心臓のグルコース取り込み能等を経時的に測定する。

#### 5. 非臨床への応用/種差

イヌ・ウサギ・ラットで心臓のバイオマーカーとしての報告があった<sup>2), 3)</sup>。体が小さいマウスでの応用例は見当たらなかった。原理的に種差はないが、小動物では心臓のサイズが小さいため技術的課題があったものの、近年はラットでの報告が複数あった。

#### 6. 非臨床への応用/薬剤応答性

糖尿病モデルラットにおいてインスリンに対する反応を捉えた報告があった<sup>4)</sup>。これまでの論文報告の多くは、自然発症疾患モデル(糖尿病モデルZDFラット、高血圧ラットSHRs)であり薬剤応答性に関する情報には現時点では限りがある<sup>5)</sup>。

#### 7. ガイドライン

いずれも臨床用の下記ガイドラインが存在する。

1. FDG PET、PET/CT 診療ガイドライン2010

2. FDG-PET がん検診ガイドライン2004、日本核医学会・臨床PET 推進会議

3. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Guidance : PET Drug Products-Current Good Manufacturing Practice (CGMP). December 2009.



## 8. まとめ

医薬品開発における安全性バイオマーカーとして、これまでに臨床での使用法は確立している。非臨床での課題（心臓の大きさへの対応）は克服されつつあるが、十分に普及しているとは言い難い。非臨床・臨床ともに活動している心臓の細胞機能を知ることができるという点で有用性が高いと考えられる。適用範囲は限定的であるが、他のマーカーと組み合わせ、非臨床・臨床の共通マーカーとして利用することが可能になることが期待されている。

## 9. 参考文献

- 1) Charissa E van den Brom, et al, Altered myocardial substrate metabolism is associated with myocardial dysfunction in early diabetic cardiomyopathy in rats: studies using positron emission tomography. *Cardiovascular Diabetology* 2009, 8:39
- 2) B Quintana-Villamandos, et al, Can 18F-FDG-PET show differences in myocardial metabolism between Wistar Kyoto rats and spontaneously hypertensive rats? *Laboratory Animals*, 47(4) 320–323, 2013
- 3) Yu M, et al, Cardiac retention of PET neuronal imaging agent LMI1195 in different species: impact of norepinephrine uptake-1 and -2 transporters. *Nucl Med Biol.* 2013 Jul;40(5):682-8.
- 4) Thackeray JT, Insulin restores myocardial presynaptic sympathetic neuronal integrity in insulin-resistant diabetic rats. *J Nucl Cardiol.* 2013 Oct;20(5):845-56.
- 5) Charissa E van den Brom, et al, Altered myocardial substrate metabolism is associated with myocardial dysfunction in early diabetic cardiomyopathy in rats: studies using positron emission tomography. *Cardiovascular Diabetology* 2009, 8:39

### C-5-2 : 心エコー

#### 1. 歴史・由来

心エコーは、探触子からの超音波が、対象の器官、部位（心筋、弁、血球）にあたり、はね返ってきた

超音波から画像データを得る技術である。

#### 2. 生理学的特徴

カラードップラ法により、血球からの情報（血球の移動速度）から血流を測定することもでき、速度や方向に応じて色分けして表示することも可能である。

#### 3. 臨床における使用の特徴 - 診断マーカーとして -

臨床においては幅広く使用されており、ガイドラインも存在する<sup>1)</sup>。

#### 4. 測定方法

超音波スキャナーの発達により、空間解像度が向上し、非臨床にも応用可能となった。

#### 5. 非臨床への応用／種差

現在では、マウス、ラット、イヌ、サルにまで適用することができる<sup>2)</sup>。

#### 6. 非臨床への応用／薬剤応答性

ヒトでも認められるdoxorubicinで引き起こされる心毒性が動物でも検出できる<sup>3)</sup>。一方で、抗がん剤によって引き起こされる無症候性の心筋障害については、診断の感度及び予測性は低いとの指摘もある<sup>4)</sup>。

#### 7. 非臨床への応用／予見性・回復性

その測定原理から、心毒性を予測するというよりもむしろ、化合物の毒性による心機能低下（異常）を検出するマーカーであり、予見性は低いと考えられる。

#### 8. 臨床／非臨床の相関性（定性的／定量的）

動物においても、イヌやサルなどの大動物からマウスまで心臓壁の厚さ、心室内腔体積、左心室駆出力などのパラメーターの定量評価が可能である<sup>5)</sup>。

#### 9. ガイドライン

循環器病の診断と治療に関するガイドラインとし

て「循環器超音波検査の適応と判読ガイドライン」が発行されている<sup>1)</sup>。

## 10. 参考文献

- 1) 循環器超音波検査の適応と判読ガイドライン (2010年改訂版) .

<http://www.j-circ.or.jp/guideline/pdf/JCS2010yoshida.h.pdf> (2014年2月閲覧) .

- 2) Moran C.M. et al. High-resolution echocardiography in the assessment of cardiac physiology and disease in preclinical models. *Exp. Physiol.* 2013 98 629-644
- 3) Dayton A. et al. Amelioration of Doxorubicin-induced cardiotoxicity by an anticancer-antioxidant dual-function compound, HO-3867. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2011 339 350-357
- 4) Dolci A. et al. Biochemical markers for prediction of chemotherapy-induced cardiotoxicity. *Am. J. Clin. Pathol.* 2008 130 688-695
- 5) Liu J. and Rigel D.F. Echocardiographic Examination in Rats and Mice. *Methods in Molecular Biology* 2009 573 139-155

## C-5-3 : Micro-CT

### 1. 歴史・由来

Micro-CTは、通常の全身用CTよりも高い線量のX線を用いることで高解像度の画像を得る技術で、走査時間を短縮できることから三次元画像の構築も可能になった。さらに、ヨード造影剤を用いることで、心臓のような軟組織観察も可能である<sup>1), 2)</sup>。

### 2. 測定方法

動物に使用できる測定機器が市販されているが、線量が高く放射線による生体への影響が無視できないことから、臓器ごとのex vivo観察が一般的である。同様の理由で、臨床での観察報告もない。

### 3. 非臨床への応用／種差

マウス、ラット、ウサギ胎児における心血管系発

生異常の検出やイヌ心臓の形態観察について報告されている。

### 4. 非臨床への応用／薬剤応答性

薬物投与との関連性など、毒性評価に関連する報告はなく、今後の研究の発展が期待される。

## 5. 参考文献

- 1) Degenhardt K, Wright AC, Horng D, Padmanabhan A, BA1, Epstein JA. Rapid Three-Dimensional Phenotyping of Cardiovascular Development in Mouse Embryos by Micro-CT with Iodine Staining. *Circ Cardiovasc Imaging.* 2010, 3: 314-322
- 2) Aslanidi OV, Nikolaidou T, Zhao J, Smaill BH, Gilbert SH, Holden AV, Lowe T, Withers PJ, Jarvis JC, Stephenson RS, Hart G, Hancox JC, Boyett MR, Zhang H. Application of Micro-Computed Tomography with Iodine Staining to Cardiac Imaging, Segmentation and Computational Model Development. *IEEE Trans Med Imaging.* 2013, 32: 8-17

## E. 結論

心臓への毒性的影響を診断するためのバイオマーカー(トロポニン、心房性ナトリウム利尿ペプチド、脳性ナトリウム利尿ペプチド、脳性ナトリウム利尿ペプチド前駆体N端フラグメント、心臓型脂肪酸結合蛋白、miRNA、及びイメージング)を詳細に検討した結果、バイオマーカーとしての実績は、miRNAを除き十分に有しており、非臨床への応用は十分に可能であると思われた。トロポニンに関しては、医薬品承認申請資料にも利用されているケースも散見され、非臨床試験への応用の妥当性は十分にあるものと考えられた。一方で、これらの評価が経時的に解析されている報告、また、一般毒性や機能への影響との関連性の報告等は無い、あるいはごく少なく、それらの評価は、各研究施設や開発会社での施設内での判断に依存している。しかし、これらの評価、データを広く普及させ、標準的な評価として確立してゆくためには、各研究施設、開発会社毎に集積し

てきたデータから、測定手法と評価手法を標準化し複数の施設でバリデーションを兼ねた共同試験が必要になってくると考えられる。これらの課題は、既にある程度評価が定まっている腎臓や、今後評価していかなければならない肝臓等にも共通しており、課題を克服してゆくには、本研究班とは別に、コンソーシアム等を形成し、検証してゆくことが必要であると考えられる。

## F. 研究業績

(口頭発表)

- 1) 花房弘之、森川裕二、上原健城、兼藤雅子、小野 敦、山田 弘、大野泰雄、漆谷徹郎、マルチプレックスイムノアッセイによる肝障害時のサイトカイン変動解析. 第40回日本毒性学会学術年会P-58 (2013.6.17 千葉県 幕張メッセ)
- 2) 大村 功、森川裕二、上原健城、林 仁美、三森国敏、南 圭一、神吉将之、小野 敦、山田弘、大野泰雄、漆谷徹郎. 肝発がんにおけるDNAメチレーションと遺伝子発現の関連. 第40回日本毒性学会学術年会P-65 (2013.6.17千葉県 幕張メッセ)
- 3) 南 圭一、上原健城、近藤千晶、大村 功、神吉将之、堀之内 彰、小野 敦、山田 弘、大野泰雄、漆谷徹郎. ラット腎におけるmRNA発現と腎障害モデルにおける変動の比較検討. 第40回日本毒性学会学術年会P-142 (2013.6.19千葉県 幕張メッセ)
- 4) 大野泰雄. 動物実験の重要性と安研協への期待. 安全性試験受託研究機関協議会 (2013.7.5 東京 市ヶ谷アルカディア)

添付資料1: バイオマーカーの評価表と事例

バイオマーカーの名称: ヒト肝臓型脂肪酸結合蛋白(hL-FABP)

評価者: 大野泰雄

記入方法: バイオマーカー評価(◎: 優れている、○: 良い、△: まあまあ、×: 悪い、?: 不明) 或いは簡潔に記載する。

1) バイオマーカー情報の由来

	出典	出典	出典	出典	出典	
文献番号	著者	論文題	出典	page	出版年	
1	Ohno et al	Biomarker of ---	Biochem. Pharma.	110-120	2010	
2						
3						
4						

2) バイオマーカーの特性

	biomarker	biomarker	biomarker	biomarker
文献番号	化学特性 (低分子/peptide/ miRNA/高分子/酵 素/他)	測定試料 (血液/尿/他)	測定方法 (LC/GC/ELISA/酵 素反応/gene chip/ 他)	メモ (測定の容易性等)
1	蛋白	尿	ELISA	一般的
2				
3				
4				
メモ				

3) バイオマーカーで検出される毒性

	対象毒性	対象毒性	対象毒性	対象毒性	対象毒性
文献番号	ヒト/動物種	臓器	検出できる傷害部 位	検出できる毒性機 構	メモ
1	ヒト	腎臓	尿細管	酸化ストレス	
2					
3					
4					
メモ					

4) バイオマーカーの再現性と活用

	再現性	再現性	再現性	活用	再現性と活用	再現性と活用
文献番号	施設内	多施設	複数の施設で検討されているか？	広く活用されているか？	メモ	メモ
1	陽性物質AとBとで再現性が確認された。	○	○	開発者以外でも活用されている。	キット化されている。	試験実施施設が偏っている。
2						
3						
4						
メモ						

5) バイオマーカーの感度(陽性物質を陽性と判定できるか?)と毒性評価における定量性

	感度	感度	感度	感度	感度	感度
文献番号	陽性物質を検出できるか？	病理学的変化との対応	可逆的変化の段階で検出できるか	非侵襲的に検査できるか。	他のマーカーとの組合せ	メモ
1	陽性物質?個で検討し、?個を陽性であると検出できたが、陽性物質Aは偽陰性となった。	病理学的変化が検出する前の段階で変化する。組織の変化と対応している。	○	○	?と組み合わせて評価することにより、感度が上がる。	TG動物実験でNSAIDによる腎傷害を検出できた。
2						
3						
4						
メモ						

6) バイオマーカーの特異性(陰性物質を陰性と判定できるか?)

	特異性	特異性	特異性	特異性	特異性	特異性	特異性
文献番号	陰性物質を陰性と判定できたか？	マーカーの生体内分布の特異性	臓器毒性の検出特異性	妨害因子	急性的変化か慢性的変化か	他のマーカーとの組合せ	メモ
1	陰性物質?個で検討し、?個を陰性であると検出できたが、陰性物質Aは偽陽性となった。	○ (腎臓以外については不明)	あり	?	傷害発生初期に増加。慢性腎障害でも上昇	?と組み合わせて評価することにより、特異性が上がる。	TG動物実験でNSAIDによる腎傷害を検出できた。
2							
3							
4							
メモ							

7) バイオマーカーの適用範囲

	適用範囲	適用範囲	適用範囲
文献番号	非臨床試験で使えるか？	臨床試験で使えるか？	メモ
1	ラット×、イヌ×	○	
2			
3			
4			
メモ			

8) バリデーションの実施状況と公的な認知

	バリデーション	バリデーション	バリデーション	認知	認知	
文献番号	検討した被験物質数 陽性/陰性	施設内バリデーションは実施されているか？	公的なバリデーションは実施されているか？	一般的な認知 (多くの機関で使われているか？)	公的認知 (EU/FDA/PMDA/その他)	メモ
1				△	日本: 保険点数付加	検討した被験物質が化学物質に偏っている。
2						
3						
4						
メモ						

9) reviewによる総合的な評価

- 例1 広い範囲の毒性物質について評価されており、臨床における安全性評価のために利用可能。
- 例2 適用範囲は限定的であり、他のマーカーと組み合わせて、臨床的に利用することが可能。
- 例3 適用範囲は限定的ではあるが、他のマーカーと組み合わせて、非臨床試験で利用することが可能。
- 例4 適用範囲は限定的であり、企業内のスクリーニングには利用できるが、公的な認知のためには更に検討すべきである。
- 例5 情報が少なく、更なる検討が必要である。

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25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）  
甘粕 晃平（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）  
渡部 一人（中外製薬株式会社）  
中村 和市（塩野義製薬株式会社）

### 研究要旨

本年度においては、主に昨年度まで着手していた「治療用ペプチドワクチンのための非臨床安全性試験に関するコンシダレーションペーパー（案）」についてさらに議論を深めて完成、英語版としての論文投稿を行った。なお、昨年度に論文投稿していた「わが国の薬事上の取り扱いにおけるアジュバントの位置づけについての考察」が、レギュラトリーサイエンス学会誌に掲載された。また、昨年度ガイドライン策定会議に参加した「アジュバントとアジュバント添加ワクチンの非臨床試験ガイドライン」が本年度において、二度のパブリックコメント収集を経て12月19日に最終化、発表された。

キーワード：アジュバント、添加剤、WHOガイドライン、治療用ペプチドワクチン

### A. 研究目的

ワクチンという名のつく医薬品は広範囲にわたっているが、製剤的な観点からは①感染症予防用ワクチン、②癌やアルツハイマー病等の非感染症に対する治療用ワクチン（免疫治療剤）、及び③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3つに分けて考えることができる。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調和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はなされていない。当調査研究グルー

プでは、これらワクチンあるいはアジュバントについてのガイドラインの国際的整合化を図る、ないしはそのための調査研究を行うことをその研究目的としている。

### B. 研究方法

本年度においては、上記③の非感染症に対する治療用ワクチンという観点から、主に昨年度まで進めていた「治療用ペプチドワクチンのための非臨床安全性試験に関するコンシダレーションペーパー（案）」について焦点を当てた活動を行った。具体的には年

度前半～中盤にかけて同コンシダレーションペーパーについての電子メールベースでの議論を行い、その後、班会議（12月17日、プログラム後掲）における未解決問題の処理を経て、英語版としての論文投稿を行った。

### C・D 研究結果及び考察

- 1) 班会議開催を経て完成させた「治療用ペプチドワクチンのための非臨床安全性試験に関するコンシダレーションペーパー」（日本語版）については後掲。
- 2) 上記とは別に昨年度に論文投稿していた「わが国の薬事上の取り扱いにおけるアジュバントの位置づけについての考察」が、レギュラトリサイエンス学会誌に掲載された（下記G-1「論文発表」及び後掲）。
- 3) さらに上記とは別に昨年度よりガイドライン策定会議に参加していた「アジュバントとアジュバント添加ワクチンの非臨床試験ガイドライン」が本年度、二度のパブリックコメント収集を経て12月19日に最終化、発表された。ガイドライン内容は下記。また以下に本ガイドラインの策定過程及びその概要について述べる。

World Health Organization. 'Guidelines on the nonclinical evaluation of vaccine adjuvants and adjuvanted vaccines'.

[http://www.who.int/biologicals/areas/vaccines/ADJUVANTS\\_Post\\_ECBS\\_edited\\_clean\\_Guidelines\\_NCE\\_Adjuvant\\_Final\\_17122013\\_WEB.pdf](http://www.who.int/biologicals/areas/vaccines/ADJUVANTS_Post_ECBS_edited_clean_Guidelines_NCE_Adjuvant_Final_17122013_WEB.pdf)

本ガイドラインは近年、ワクチンにおいて新規性の高いアジュバントが多用されつつあることに伴い、新たにそれを前提としたワクチンガイドラインを作成する必要性が生じてきたことに対応して策定されたものである。これまで発出されたガイドラインについて、既にWHOでは2004年及び2005年にそれぞれワクチンの臨床及び非臨床評価ガイ

ドラインを発表していたものの、これらはいずれもアジュバント使用を大きく視野に入れたものではなかった。またEMAにおいては2005年にワクチンのアジュバントガイドラインを作成していたものの、その後開発されたアジュバントの種類と数は著しく、ワクチン開発を行う上で不都合となる部分が拡大していた。アジュバントの種類についてみれば、従来のアルミニウム塩を主体としたアジュバント以外のアジュバント、例えばTLR作用型のアジュバント、あるいはoil-in-water型のアジュバントの開発が特徴的と言える。

このような背景の元、WHOにおいて2011年9月より「アジュバントとアジュバント添加ワクチンの非臨床試験ガイドライン」の策定が開始された。策定プロジェクト翌年（2012年）より、当ワクチン非臨床調査研究グループにおいては必要な議論を開始した。当該議論内容を踏まえて研究分担者は同年11月にWHO本部で開催された専門家会議に参加、約20ヶ国、40余名の産官学メンバーとの議論を行った。

本ガイドラインは、わが国の「感染症予防ワクチンの非臨床試験ガイドライン」(薬食審査発0527第1号、平成22(2010)年5月27日発出)を含めた関連ガイドラインの内容を踏まえて作成されている。また2005年版のWHOガイドライン(ワクチン非臨床)と比較した場合、「アジュバントの使用に関する理論的根拠」や「ヒト初回投与試験」等、全く新たな項目が付け加わっているのが特徴である。一方、既に2005年版(ワクチン非臨床)に存在していたものの、内容について修正された事項として「ガイドラインの適用範囲」、「アジュバント添加ワクチンの反復投与毒性試験における投与回数」、「同、生殖発生毒性試験における投与時期」、「アジュバント単独での毒性評価」等が存在する。とりわけ「アジュバント単独での毒性評価」については、これまで「新規アジュバントを開発する場合、それが用いられるワクチン製剤とは別に独立した毒性試験を実施し」、かつ「その毒性試験においては化学合成医薬品と同様の基準で2種動物(げっ歯類及び非げっ歯類)の使用が必要」と明



記していた2005年版のWHOガイドライン(ワクチン非臨床)、さらにはEMAのアジュバントガイドラインとも内容を異にしている。従って、これは今回のガイドラインにおいて最も変更の大きい事項の一つと言える。

アジュバントに付随する安全性懸念の一つに自己免疫疾患があると言われる。よく知られるものとして米兵において発症したいわゆる「湾岸戦争症候群」は、炭疽菌ワクチンの接種、それもアジュバントに関係していたとする仮説が存在する。本件については、今回のガイドライン策定活動とほぼ軌を一にして実施され、研究分担者も活動に参加したILSI/HESI(国際生命科学研究機構/健康環境科学研究所)の「アジュバントと自己免疫」プロジェクトにおいて行われた議論が重要である。当該議論を踏まえた結果、今回のWHOガイドラインの中に「現時点において、アジュバントにより自己免疫疾患が誘発されるという有力な臨床的な証拠は存在せず」、「現時点で、本件に関する確固とした動物モデルは存在しない」、さらに「自己免疫疾患は複雑かつ多要因が絡む現象であり、追加のバイオマーカーを同定するさらなる研究が必要である」の文言が加えられた。

さて今回のガイドラインは感染症に対する予防及び治療を目的にしたアジュバント添加ワクチンをその主な適用範囲にしているが、同時に「ガイドラインの原則のいくつかは非感染症に対する治療用ワクチンにも適用できるかも知れない」としている。それでは逆に、今回のガイドラインにおいて治療用ワクチンに適用できない部分は具体的にどこであろうか。これについて、当調査研究グループでは上記1)「治療用ペプチドワクチンのための非臨床安全性試験に関するコンシダレーションペーパー」において、癌・アレルギーに対する治療用ペプチドワクチンにおいては「動物種選択の妥当性についての考え方」、及び「アジュバント単独に対して必要な毒性試験のあり方」が今回のガイドラインとは異なるとの見解を明らかにしている。

最後に今回のガイドラインには、「免疫促進生物

活性に基づくアジュバントの定義に加え、各国それぞれアジュバント成分の規制あるいは法的分類が存在し得る」旨の記述がある。わが国においてアジュバントは添加剤として位置づけられているが、添加剤としてのアジュバントの位置付けと免疫補助剤としてのアジュバントの実体との間の隔たりが大きくなり、現在、規制を行う上で様々な問題が生じつつある。当調査研究グループとしては、上記2)の論文において、当該問題の考察を行っている。

## E. 結論

癌やアルツハイマー病等に対する治療用ワクチンの開発に必要な非臨床安全性試験は、感染症予防ワクチンにおいて必要なそれとは異なると考えられる。当調査研究グループでは当該事項を「治療用ペプチドワクチンのための非臨床安全性試験に関するコンシダレーションペーパー」としてまとめ、今年度において論文投稿を行なった。

現在、薬局方上での解釈により、わが国の薬事上の取り扱いにおいてワクチンアジュバントは添加物として位置づけられているものの、添加物の範疇を超えるアジュバントが出現しつつあることから、毒性評価を含むアジュバントの規制に関し、様々の矛盾を生じている。当調査研究グループでは当該問題を重視し、問題の分析と解決策の提示を試みた論文「わが国の薬事上の取り扱いにおけるアジュバントの位置づけについての考察」を、レギュラトリーサイエンス学会誌に掲載した。

近年、新規性の高いアジュバントが数多く開発されつつあることに伴い、2011年より策定活動が開始され、当調査研究グループとしても議論を行っていた「アジュバントとアジュバント添加ワクチンの非臨床試験ガイドライン」が今年度において最終化された。当該ガイドラインは2005年版のWHOガイドラインと比較した場合、「アジュバントの使用に関する理論的根拠」及び「ヒト初回投与試験」の項が新たに加わり、また「ガイドラインの適用範囲」、「アジュバント添加ワクチンの反復投与毒性試験における投与回数」、「同、生殖発生毒性試験における投与時

期」及び「アジュバント単独での毒性評価」等について変更が行われている。

## F. 健康危惧情報

該当しない。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

「(オピニオン) わが国の薬事上の取り扱いにおけるアジュバントの位置づけについての考察」、松本峰男、レギュラトリーサイエンス学会誌 (vol.3, no.3,

p.175-180, 2013)

### 2. 学会発表

第7回 次世代アジュバント研究会「ワクチンアジュバント開発に必要な非臨床安全性評価-WHOガイドラインを中心として-」(松本)

(2014年1月21日、独立行政法人 医薬基盤研究所主催、大阪府豊中市)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

該当しない。

平成25年度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

医薬品の品質、有効性及び安全性確保のための手法の国際的整合性を旨とした調査と妥当性研究「ワクチンの非臨床ガイドライン策定に関する調査研究」

### 第1回班会議 プログラム

日時：12月17日（火）15:00～17:30

場所：医薬品医療機器総合機構 6階（西） 会議室 4  
〒100-0013 東京都千代田区霞が関 3-3-2 新霞が関ビル（TEL:  
03-3506-9487）

出席者

研究分担者：

松本峰男 （独）医薬品医療機器総合機構 信頼性保証部

協力研究者：

真木一茂 （独）医薬品医療機器総合機構 再生医療製品等審査部

小松真一 グラクソ・スミスクライン株式会社 前臨床開発部

土本まゆみ サノフィ株式会社 研究開発部門

松井元 一般財団法人 化学及血清療法研究所 病理部

オブザーバー：

小野寺博志 （独）医薬品医療機器総合機構 新薬審査部

笹木修 （独）医薬品医療機器総合機構 新薬審査部

甘粕晃平 （独）医薬品医療機器総合機構 新薬審査部

澤田純一 （独）医薬品医療機器総合機構 再生医療製品等審査部

渡部一人 中外製薬株式会社 研究本部

議題：

1. 状況報告
2. 治療用ペプチドワクチン非臨床試験に関するコンシダレーションペーパー（案）についての議論
3. 今後の予定

オピニオン

## わが国の薬事上の取り扱いにおける アジュバントの位置づけについての考察

### Consideration of the Regulatory Issues for Vaccine Adjuvants in Japan

松本 峰男

Mineo MATSUMOTO

#### Abstract

In Japan, the position of the vaccine adjuvants in the pharmaceutical regulation has not been established, although both the EU and the US have adopted specific positions with regard to the regulation of vaccine adjuvants. In Japan, adjuvants are currently classified into excipients according to the Japanese Pharmacopoeia. However, the novel adjuvants that exceed category of excipients (which must be harmless and should not show any pharmacological effects) have induced regulatory problems. These include 1) the necessity of a statement in every review report that the adjuvant should not be used in other drug products like a general excipient, but used only for vaccine products, 2) limitation of the safety information assigned for adjuvants in the common technical document (CTD), 3) no requirement of GMP compliance, 4) concerns about requiring excessive, or conversely, insufficient toxicological evaluation for adjuvants, and 5) concerns about the delay of the timing of toxicity studies needed for adjuvants (e.g., genotoxicity studies) as compared with the stages of clinical trials of vaccines. It should be noted that no vaccine adjuvant has yet been authorized in its own right; adjuvants have been approved as components of vaccine products in all three regions. Therefore, it does not seem realistic to regard adjuvants as one of the active components of a vaccine. Instead, we hereby propose that the appropriate position for adjuvants as different from excipients be newly established in Japan, which is consistent with the regulation of both the EU and the US.

#### 抄 録

わが国のワクチン規制においては、解決すべき問題が存在する。それは、薬事上の取り扱いにおいてアジュバントの位置付けが確立していないという問題である。これは既にアジュバントがワクチン有効成分に並んだそれ独自の位置づけを有する欧米とは対照的な状況にある。わが国においてアジュバントに与えられているのは添加物という位置づけであるが、これはもっぱら旧来の日本薬局方の記載に依ったものである。しかしながら近年、添加物の範疇（薬理作用を示さず、無害）を超えたアジュバントが登場してきたことで、ワクチン規制において以下に述べるような問題が提起されている。すなわちアジュバントについて、1) 分類上は添加物ではありながらも、一般的な使用前例としては扱わない旨の但し書きを毎度審査報告書に記載する必要性が生じる、2) CTDで割り当てられる記載範囲が限られる、3)