

## - 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 客員研究員）

### 研究要旨

バイオマーカーは、医薬品の活用において患者層別化に寄与することなどから個別医療への貢献が期待されている。さらには病態との関連を明確にすることから医薬品開発段階においても利用されることが期待され、医薬品開発の効率化に寄与している。本研究においては、医薬品開発段階での安全性評価に利用されるバイオマーカーに焦点をあて文献調査研究を進めてきた。前年度までに、安全性バイオマーカーとして肝臓、腎臓、心臓、神経、血管・炎症、精巣、消化管、骨について、調査を実施し、肝臓、腎臓、心臓などにおいては、安全性バイオマーカーとして期待できることを報告してきた。このような安全性バイオマーカーに関しての関心は高く、その可能性が報告されている一方で、個々のバイオマーカーに関して、バリデーションなどを含めて、どのような研究がされ、安全性バイオマーカーとしてどのような課題があるかに関しては、まとめられていない部分が多く、バイオマーカーの可能性や必要性に言及する段階に留まっている現状もある。

そこで本年度は、医薬品開発の上で、個々の安全性バイオマーカーの臨床的・非臨床的な有用性を評価する試みを行うこととした。その材料として、文献的な評価が一定程度されていること、臨床で診断応用されているにも関わらず、非臨床安全性評価においては十分に活用されていない、さらには従来的一般毒性試験等の臨床病理学的検査において評価に加えられる可能性が高いものとして、心臓毒性マーカーを選択し、評価した。心臓には、トロポニンなど臨床応用されている事例が多く、かつ非臨床一般毒性試験における臨床病理学的検査には含まれていない等、上述の条件に一致する点が多い。なお、今回の調査においては、これらに加えて今後、研究及び臨床応用が期待されるmiRNA、イメージングを対象に含めた。

各調査において、心臓への影響を診断するパラメーターとしての実績は、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ことが再確認された。ま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ない、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。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、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。

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

田口和彦( Bristol・マイヤーズ)、 本山径子( ヤンセンファーマ)、 荻野大和( トーアエイヨー)、 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)、 佐々木正治( アッヴィ)、 鈴木 睦( 協和発酵キリン)、 服部慎一( 三和化学研究所)、 森山賢二( 大鵬薬品工業)、 小崎 司( 富山化学工業)、 友廣雅之( 日本アルコン)、 小林章男( 日本たばこ産業)、 三浦慎一( 第一三共)、 中村和市( 塩野義製薬)：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

高橋光一、石塚修司：久光製薬(株)研究開発本部  
基礎研究所

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とらえるか、また、それをどのように評価し、開発過程における意志決定に反映させるかが重要である。その際、臨床における病気による苦痛の軽減や延命、Quality of Lifeの改善などの真の臨床指標が明確かつ短期的に把握できるものは開発を進めやすい。しかし、長期間における作用の結果現れる薬効や副作用、体外からは観察しにくい副作用については、通常の臨床試験で行われている数ヶ月程度の臨床試験では捉えられないことがある。このような場合、検出された時には既に重篤化していたり、販売承認を受けた後に思いがけない副作用が検出されたりして、回収・販売停止等の措置につながる可能性がある。したがって、安全性評価に関わるバイオマーカーでは、毒性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22～24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、骨毒性、及び消化管毒性に関わるバイオマーカー情報を検索し、有用と思われるものを抽出し、報告してきた。

今年度は、これらのバイオマーカーが真に非臨床試験や臨床試験に使用できるか否かについて評価する試みを、心臓毒性マーカーを材料として実施した。

#### 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)

#### B. 方法

今までの調査結果を踏まえて、バイオマーカーを評価するためのポイントについて審議し、表としてまとめた(添付資料1)。ついで、心臓毒性についてのバイオマーカーを検討することとし、従来の調査結果に基づき、ワーキンググループ委員はそれぞれ評価すべきバイオマーカーを分担し、前記の表に基づいて基本的な情報の有無とその内容について文献調査を実施し、その結果をワーキンググループで評価した。これに基づき、評価結果を文書としてまとめた。

## C . 結 果

### C-1 : トロポニン

#### 1 . 歴史・由来

トロポニン (Tn) は筋収縮のカルシウム調節を担う蛋白質であり、東京大学医学部の江橋節郎らのグループによって1965年に発見された<sup>1)</sup>。心筋梗塞等の心筋損傷の診断に汎用されてきた生化学的指標は、CK、AST、LDHなどの血清酵素であったが、これらは全身の筋細胞からも逸脱する酵素であるため、運動や筋肉注射などの因子によっても変動する。したがって、筋肉の構成成分を筋損傷の指標として利用する考えが提唱され、心筋Tn (cTn) の測定の基礎と臨床的評価が検討されてきた<sup>2)</sup>。

#### 2 . 生理学的特徴

TnはTnI、TnT及びTnCの3つの成分によって構成される複合タンパク質であり、カルシウムの活性化に關与して筋収縮機能を調節している。cTnは心筋特異性が高く、心筋損傷のバイオマーカーとして汎用されている。これらの中で、cTnT及びcTnIは心筋と骨格筋でアミノ酸配列が異なるため、特に高い心筋特異性を示す。近年、cTnは筋壊死だけではなく、心不全、腎不全、敗血症、肺塞栓などでも上昇することが報告されている<sup>3)</sup>。

#### 3 . 臨床における使用の特徴 診断マーカーとして

cTnは心筋梗塞の診断基準のバイオマーカーとして確立されている<sup>4), 5)</sup>。また、慢性心不全のマーカーとしても有用性が認められており、慢性心不全治療ガイドライン<sup>6)</sup>において、cTn測定は重症度、予後評価でクラスIIa (エビデンスから有用であることが支持される) に分類されている。ただし、cTnをガイドとした心不全治療の予後改善効果をみた大規模な前向き研究はなく、慢性心不全ガイドラインにおいても治療効果判定としては述べられていない<sup>7)</sup>。慢性心不全ではcTnが測定感度以上の高値を示すのはわずか10%前後であるため、予後予測のためには、より高感度な測定による定量評価が必要とされている<sup>7)</sup>。

#### 4 . 測定方法

2007年に米国ACC/AHA、欧州ESC、世界心臓病連合 (WHF) の共同タスクフォースから心筋梗塞の国際的診断基準が発表され<sup>4)</sup>、心筋に特異性のあるバイオマーカーはcTnであり、診断のための基準値は健常者の99パーセンタイル値で、その値以下でのCVが10%未満を示すcTn測定法が推奨されたことから、高感度測定試薬の開発が進展した。

ARCHITECT STATを用いた高感度cTnI測定法 (cTnI hs-ARCH)、ADVIA Centaur XPを用いた高感度cTnI測定法 (cTnI-Ultra) 及びモジュラーアナリティクスを用いた高感度cTnT測定法 (cTnT-hs) の性能を比較した報告<sup>8)</sup>では、測定原理は上記3法とも異なるが、測定結果の再現性はほぼ同程度であり、定量下限はcTnI hs-ARCHが2.5 pg/mLと最も感度が高かった。

#### 5 . 非臨床への応用 / 種差

cTnI及びcTnTは、ラット、マウス、イヌ及びサル等の複数動物種において心筋傷害の鋭敏かつ特異的なバイオマーカーとして利用されている<sup>3), 9)</sup>。ラットではDatabase (Tissue-specific Gene Expression and Regulation: TiGER) を用いて30臓器についてTnni3 (cTnI) 及びTnnt2 (cTnT) の遺伝子を調べた結果、これら遺伝子の心臓特異的発現が確認されている<sup>10)</sup>。また、サルではcTnT及びcTnIともに、心臓以外の臓器 (肺、胃、十二指腸、大腸、肝臓、腎臓、脳及び骨格筋) ではほとんど検出されない<sup>11)</sup>。なお、測定方法によっては種によって検出感度が異なる場合があるので、薬物応答性の種差を調べる上では注意が必要である<sup>9)</sup>。

#### 6 . 非臨床への応用 / 薬剤応答性

臨床のみならず非臨床においても、バイオマーカーとしてのcTnの有用性については多くの報告があり、既に広く利用されている<sup>12)</sup>。さらに、上市済みの複数医薬品で非臨床毒性試験においてcTnが測定されており、安全性評価の一環として実用化されている。

## 7. 非臨床への応用 / 予見性・回復性

カニクイザルにIsoproterenol(0.03, 0.3, 3 mg/kg)及びVasopressin(0.3 mg/kg)を単回併用投与すると、(最初の測定時点である)投与2時間後からcTnI及びcTnTが上昇、3~8時間をピークにその後減少し、投与3~7日後には回復する<sup>11)</sup>。このことは、心筋傷害発生後速やかにTnが上昇し、傷害が持続しなければ血中から消失することを示唆している。

## 8. 非臨床への応用 / 病理との相関

先に述べたカニクイザルを用いた試験において、各種血中バイオマーカー(AST、ALT、LDH、CPK、ALD、Mb、CRP、H-FABP、cTnT及びcTnI)のうちcTnT及びcTnIが心臓病理所見の程度と極めて高く相関していることが示されている<sup>11)</sup>。また、ラットにおいても薬物(Isoproterenol、Metaproterenol、Cyclophosphamide、Acetaminophen、Methapyrilene、Naphthylisothiocyanate、Doxorubicin、Mitoxantrone、Allylamine、Aminoglutethimide、Cyclosporine A及びAllyl alcohol)を単回投与後の各種血中バイオマーカー(AST、LDH、CK、ALT、TBil、DBil、GGT、cTnI、cTnT、FABP3、MYL3、sTnI)のCmax及びAUCに対する心臓病理所見のROC解析を実施した結果、cTnI及びcTnTが診断マーカーとして最も有用であることが示唆された<sup>10)</sup>。なお、Tn高感度測定法の発達により、病理所見を伴わずにTnがわずかに上昇する場合もある<sup>3)</sup>。

## 9. 臨床 / 非臨床の相関性 (定性的 / 定量的)

上記で述べたように、cTnは臨床 / 非臨床ともに心毒性を検出できるバイオマーカーである。今後、さらに本格的なバイオマーカーにしていくためには、臨床で用いられている測定基準を参考に、非臨床においても(測定系の違いを考慮した)検出感度と病理組織変化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

2007年に米国ACC/AHA、欧州ESC、世界心臓病連合(WHF)の共同タスクフォースから心筋梗塞の国際的診断基準<sup>3)</sup>が発表され、cTnの高感度測定値が最

も心筋特異的で診断上信頼がおけるバイオマーカーと評価された。また、2010年に改訂された日本循環器学会の「慢性心不全治療ガイドライン」<sup>6)</sup>では、cTnが心不全の重症度・予後評価のバイオマーカーとしてClass IIaに分類された。

## 11. まとめ

トロポニン(心筋梗塞の診断)においてはすでに確立されたバイオマーカーであるが、高感度測定系の開発により心筋梗塞の早期診断や心不全診断への応用に関してさらなるエビデンスの構築が期待される。今後、さらにほかの様々な生化学的指標と組み合わせることでリスク評価を行うマルチバイオマーカーストラテジーが、心血管疾患診療に有用な戦略となっていくことが期待されている<sup>7)</sup>。トロポニンは、ラット、マウス、イヌ及びサルにおいても心筋傷害の高感度かつ臓器特異性の高いバイオマーカーとして利用されているが<sup>9)</sup>、測定方法によっては検出感度が異なる動物種があるため、薬物応答性の種差を調べる上では注意が必要である。

## 12. 参考文献

- 1) Ebashi S. and Kodama A., A new protein factor promoting aggregation of tropomyosin. *J. Biochem.*, 59: 425-426, 1965.
- 2) 心筋梗塞の新しい診断指標、高木康、医学のあゆみ、161(12): 937-937, 1992.
- 3) Newby L. K. et al., Troponin measurements during drug development --considerations for monitoring and management of potential cardiotoxicity: An educational collaboration among the Cardiac Safety Research Consortium, the Duke Clinical Research Institute, and the US Food and Drug Administration. *Am. Heart J.*, Jul; 162(1): 64-73, 2011.
- 4) Thygesen K. et al., Joint ESC / ACCF / AHA / WHF Task Force for the Redefinition of Myo-cardial infarction. Universal definition of myocardial Infarction. *Circulation*, 116: 2634-2653, 2007.
- 5) Morrow D. A. et al., National Academy of Clinical

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 infarction. 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(特にがん領域)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ない、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)