

ライン（特にS6（R1））での対応の可／不可といった側面から整理し、本邦での指針作成に資する情報として発信してゆくことを目指した。本研究期間内に完結することはできなかったが、今後も粛々と当該課題に取り組んでゆきたい。尚、今回ここでは取り扱わない事にした品質に関する問題や、核酸医薬品としてひとくくりにはできない多様性なども、重要な論点として認識されており、今後の知見の蓄積によって、改めて取り組むべき課題と考えている。

#### E. 結 論

S6（R1）ガイドラインの策定を支援するための先行研究に引き続き、国内の産官学の関係組織（PMDA、JPMA、阪大）などから研究協力者の参加を得て、核酸医薬品などのタンパク製剤に限定しない生物製剤の非臨床安全性評価に関するS6（R1）ガイドライン適用の可否といった側面からの調査研究を行い、一定の成果を得た。

#### F. 健康危険情報

該当しない

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Hirabayashi Y. Radiation-induced, cell cycle-related gene expression in aging hematopoietic stem cells: enigma of their recovery. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2014; **1310** (*The Bone Marrow Niche, Stem Cells, and Leukemia: Impact of Drugs, Chemicals, and the Environment*): 69-73.

##### 2. 学会発表

該当しない

#### H. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得

該当しない

##### 2. 実用新案登録

該当しない

##### 3. その他

該当しない

**CURRENT STATUS AND ISSUES RELATED TO ACCUMULATING THE EXPERIENCES IN THE PRECLINICAL ASSESSMENT OF OLIGONUCLEOTIDE THERAPEUTICS**  
CO-CHAIR: Y HIRABAYASHI AND JW VAN DER LAAN

- Introduction: Is S6(R1) applicable for oligonucleotide therapeutics? T Nakazawa
- Frequent asked questions on the preclinical assessment of oligonucleotide therapeutics at EMA Scientific Advise meetings JW van der Laan
- Frequent asked questions on the preclinical assessment of oligonucleotide therapeutics at PMDA Consultation meetings K Maki
- Preclinical issues experienced in the R&D of oligonucleotide therapeutics in the USA and OSWG recommendations AA Levin
- Discussions related to the identification of preclinical issues specific for oligonucleotide therapeutics

## Background

- A sentence written in Scope section of original S6 document
  - The principles outlined in this guidance may also be applicable to ..., and oligonucleotide drugs.

↓

However, S6(R1) EWG members felt oligonucleotides are too different to be simply adopted the guideline

Jul 2, 2014 Bio Working Group Meeting 4

## INTRODUCTION

### IS S6(R1) APPLICABLE FOR OLIGONUCLEOTIDE THERAPEUTICS?

T. Nakazawa

## Similarities and Differences

- Biopharmaceuticals
- Oligonucleotides

Similarities	
<ul style="list-style-type: none"> <li>– Species differences</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Species differences</li> </ul>
Differences	
<ul style="list-style-type: none"> <li>– Rare off-target effects</li> <li>– Extracellular targets</li> <li>– Catabolized usually to natural amino acids</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– On-target and off-target effects</li> <li>– Intracellular and/or extracellular targets</li> <li>– Catabolized and metabolized to non-natural nucleic acids in many cases</li> </ul>

Jul 2, 2014 Bio Working Group Meeting 5

## Contents of Presentation

- Background
  - S6(R1) for Oligonucleotides
- Simulation of applicability of S6(R1)
  - Case study using a model oligonucleotide
- Conclusion

Jul 2, 2014 Bio Working Group Meeting 3

## Case Study

### A Model Oligonucleotide “X”

- “X” is antisense with phosphotioate (PS) and 2'-MOE modifications
- Indication: rheumatoid arthritis (RA)
  - Patients population include WOCBP
  - Chronic use
- Clinical candidate “X” is pharmacologically active only in NHP, and its surrogate “Y” is mouse antisense for the same target

↓

*Sponsor “A” conducted preclinical safety assessment based on S6(R1) but made some modifications*

Jul 2, 2014 Bio Working Group Meeting 6

## Genotoxicity Studies

- Sponsor "A" conducted a battery of genotoxicity tests, as S6(R1) cannot be adopted
  - "X" is expected to pass through the cell membrane and interact with mRNA
  - "X" would be degraded and metabolized to create non-natural metabolites
- Negative in all the tests

Not use S6(R1) as a checklist

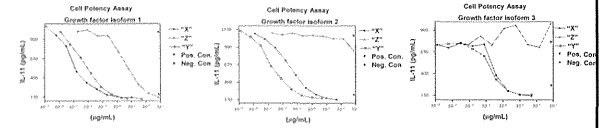
Jul 2, 2014

Bio Working Group Meeting

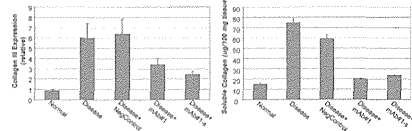
7

## In vitro and In vivo Analysis

"X" = clinical candidate; "Y" = surrogate



Model of fibrosis



"X" and "Y" are Similar

Jul 2, 2014

Bio Working Group Meeting

10

## Species Selection

- Sponsor "A" selected NHP according to S6(R1)
  - NHP is relevant (i.e., pharmacologically responsive) animal species to assess
    - Exaggerated pharmacology
    - Off-target toxicity
- "A" also decided to use mouse surrogate "Y" for the second animal species study
  - Mouse, rat, dog or rabbit are not responsive to "X"

Jul 2, 2014

Bio Working Group Meeting

8

## Repeat Dose Toxicity Studies

### Exaggerated pharmacology

- Clinical candidate "X" caused no cardiac toxicity due to exaggerated pharmacology in repeat dose toxicity studies in NHP
  - Surrogate "Y" caused cardiac toxicity with histopathology in repeat dose toxicity studies in mice
- ↓
- Histopathology was not consistent
  - Sponsor "A" considered the NHP results are more relevant than the mouse ones
    - According to literatures, physiology of the target tissue is comparable in NHP and humans, but not in mice

Evaluate results based on understanding of how much relevant the test system used

Jul 2, 2014

Bio Working Group Meeting

Case Study 2<sup>1</sup>

## Comparability of "Y" with "X"

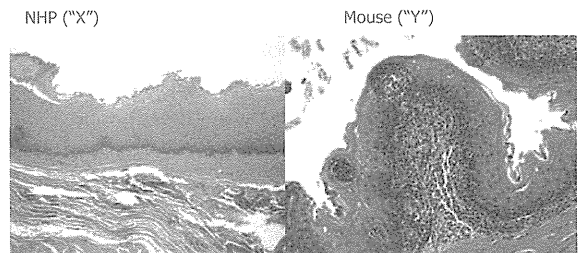
- According to S6(R1), sponsor "A" should note the differences between "X" and "Y"
  - Sponsor "A" decided to analyze the comparability on the production process, range of impurities/contaminants, pharmacokinetics, and exact pharmacological mechanism

Jul 2, 2014

Bio Working Group Meeting

9

## Histopathology



Jul 2, 2014

Bio Working Group Meeting

12

### Repeat Dose Toxicity Studies Off-target Toxicity

- Clinical candidate "X" caused apparent complement activation and slight liver toxicity in NHP
- Surrogate "Y" caused weak complement activation and severe liver toxicity in mice
  - NOAEL was not achieved

↓

- Similar toxicological findings with different severity were observed
  - Complement activation may be due to a class effect for PS antisenses
    - NHP is known more sensitive for complement activation than mouse

Jul 2, 2014 Bio Working Group Meeting 13

### Reproductive/Development Toxicity Studies

- Sponsor "A" had a regulatory consultation
  - Sponsor question: Given negative mouse results of "Y" besides literature information on KO mice, no NHP reproductive/developmental toxicity studies are planned. Please confirm this approach is acceptable.
  - Agency response: This is not acceptable. Should perform the same toxicity studies using the product intended for use in the clinic.

↓

- Sponsor "A" conducted similar studies with "X" in NHP using ePPND design recommended by S6(R1)
  - No reproductive/developmental toxicities were observed

Jul 2, 2014 Bio Working Group Meeting 16

### Repeat Dose Toxicity Studies Off-target Toxicity (Cont'd)

- Similar toxicity with different severity
  - Liver toxicity also seemed to be a class toxicity, but one cannot rule out the possibility of surrogate-specific toxicity
  - Liver concentrations of "Y" in mice were much higher than liver concentrations of "X" in NHP

↓ *Scientifically justify the approach*

- Sponsor "A" decided to conduct additional repeat dose toxicity studies with "X" in mice
  - "X" caused slight liver toxicity with lower liver concentrations
- "A" considered the results of "X" in mice and NHP are more relevant than "Y" in mice for clinical dose-setting

Jul 2, 2014 Bio Working Group Meeting 14

### Current Status of "X"

- Completed Ph 2 studies
  - Promising efficacy and safety profile
    - No cardiac toxicity in humans
    - Modest complement activation and mild liver toxicity in humans
- Sponsor "A" is concerned about how to assess the carcinogenic potential of clinical candidate "X"
  - The carcinogenicity assessment is necessary, since "X" will be used chronically
  - As surrogate "Y" has different toxicity profile, the data interpretation is difficult
    - If positive, how should the results be extrapolated to humans?
    - If negative, are the findings meaningful?

*Scientifically justify the approach*

Jul 2, 2014 Bio Working Group Meeting 17

### Reproductive/Development Toxicity Studies

- Sponsor "A" decided to conduct reproductive/developmental toxicity studies in mice using surrogate "Y"
  - RA patient population will include WOCBP
  - Literature information on transgenic mice has not identified any concerns about the potential toxicity on reproduction and development by the inhibition of target pathway
  - NHP reproductive/developmental toxicity studies are expensive

↓

- "Y" had no effects on fertility, embryofetal development and pre and postnatal development

Jul 2, 2014 Bio Working Group Meeting 15

### Conclusion

- S6(R1) could be applicable for oligonucleotides
  - "Case-by-case" approach stressed in S6(R1) may be useful

↓

- However, it is not easy to use S6(R1) for oligonucleotides
  - Lots of modifications may be needed

Jul 2, 2014 Bio Working Group Meeting 18

**FREQUENT ASKED QUESTIONS  
ON THE PRECLINICAL  
ASSESSMENT OF  
OLIGONUCLEOTIDE  
THERAPEUTICS AT EMA  
SCIENTIFIC ADVISE MEETINGS**

Jan Willem van der Laan  
Senior Pharmacological and Toxicological Assessor  
Medicines Evaluation Board, The Netherlands  
Chair Safety Working Party, EMA/CHMP

- Number of MAA's
  - 1: Mipomersen, withdrawn in 2013
- N<sup>o</sup> year number products

year	number	products
2006	2	
2007	2	1 withdrawn
2008	4	
2009	3	
2010	4	
2011	5	(1 withdrawn)
2012	3	
2013	7	

22

Testing of Oligonucleotide Pharmaceuticals  
from European Perspective

Japanese Society of Toxicology Meeting, Kobe, July 2014

Jan Willem van der Laan  
Senior Pharmacological and Toxicological Assessor  
Medicines Evaluation Board, The Netherlands  
Chair Safety Working Party, EMA/CHMP

20

SA topics	Nr. Products
Reproduction toxicity	10
Carcinogenicity	8
Overall acceptance of NC programme	8
Genotoxicity	5
Species Selection	3
Toxicology study design (dosing, route, dose escalation)	3
Environmental risk assessment	2
PK/TK examination	2
Safety Pharmacology	2
Local Tolerance	1
Immunotoxicity	1

### Overview

- European Registration of Human Pharmaceuticals
- International Conference on Harmonisation
- European approaches
  - Clinically relevancy
  - Emphasis on 3Rs
- Current topics
  - Nonhuman primates
  - Carcinogenicity testing
  - Reproductive Toxicity testing

21

### Topics where guidance is needed

- Allometric scaling

Is there sufficient evidence to conclude extrapolation between species on mg/kg basis is justified?

	NHP	Patients
Dose (mg/kg)	1	1
C <sub>max</sub> (ng/mL)	8.04 (4.62)	15.32 (5.4)
AUC <sub>0-24h</sub> (ng <sup>h</sup> /mL)	11.01 (5.1)	15.39 (6.0)
T <sub>1/2β</sub> (hr)	0.90 (0.03)	0.55 (0.15)

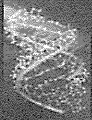
• C<sub>max</sub> and AUC<sub>0-24h</sub> were similar for both human and NHP

24

Topics where guidance is needed

- Species specificity
  - One or two species? Mipomersen use homologues in mice and monkeys.
  - What is the added value of monkeys versus rodents or:
  - What is the added value of rodents versus monkeys/minipigs
- Pharmacology/Toxicity
  - Toxicity as on target-mediated exaggerated pharmacology
  - Off-target RNA interaction, class-effects
  - Backbone related effects
- Duration of chronic toxicity
  - 6 months or 9 months
- Immunogenicity, might be with a high incidence. Clinical relevance?

25



**REVIEW OF OLIGONUCLEOTIDE  
THERAPEUTICS IN PMDA**

**Kazushige MAKI**

*Toxicology*

*Pharmaceuticals and Medical Devices Agency (PMDA)*

Topics where guidance is needed

- Example of homologue versus product:  
For mipomersen, both inactive product (P) and active homologue (H) were used in carcinogenicity studies

Mouse  
P: no tumours  
H: hepatocellular adenomas (pharmacology related)

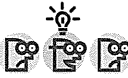
Rat  
P: skin subcutis: fibrosarcomas  
H: skin subcutis: fibrosarcomas → Class effect?

- What is the need for these carcinogenicity studies, are there more examples?

26

## Disclaimer

- The views expressed in this presentation are those of the presenter, and do not necessarily reflect the official views of PMDA.





## Outline

- Introduction of PMDA
- Review and Consultation for Oligonucleotide Therapeutics in PMDA
- Present Issues

## Introduction of PMDA

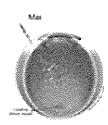

### Two Japanese Regulatory Authorities

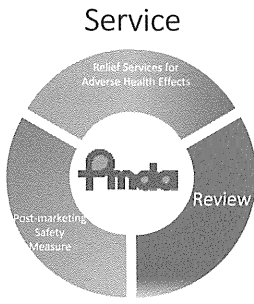
- Ministry of Health, Labor and Welfare (MHLW)**  
 Planning basic policy, enforcement of administrative measures based on the law
  - Marketing authorization of pharmaceuticals and medical devices
  - Issue emergency safety information and direct product withdrawal
  - Safety measures for emergent and significant cases
- Pharmaceuticals and Medical Devices Agency (PMDA)**  
 Review, examination and data analysis
  - Scientific review, GMP/GSP/GCP inspection and consultation on the development of pharmaceuticals and medical devices for marketing authorization
  - Collection, analysis and dissemination of information relating to quality, efficacy and safety of pharmaceuticals and medical devices

## Approved Oligonucleotide Therapeutics

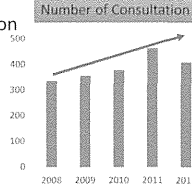
Products	Type	Indication	Approved
Vitravene	Antisense	Cytomegalovirus retinitis	US EU
Macugen	Aptamer	Age-related macular degeneration	US EU Japan
Kynamro	Antisense	Homozygous familial hypercholesterolemia	US

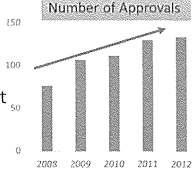
## Introduction of PMDA



**Consultation**



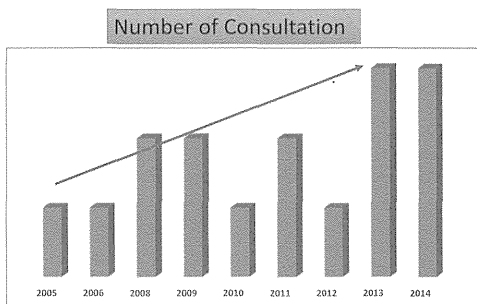

**Review**



**Standards Development**

- GMP/GCP/GSP
- GMP/QMS etc.

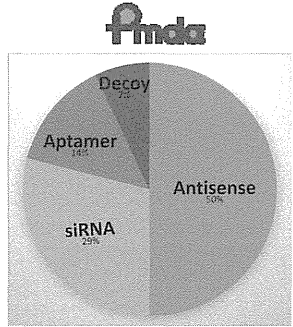
## Consultation for Oligonucleotide Therapeutics in PMDA

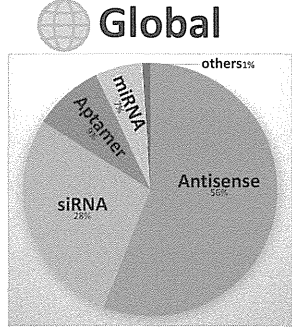
## Outline

- Introduction of PMDA
- Review and Consultation for Oligonucleotide Therapeutics in PMDA
- Present Issues

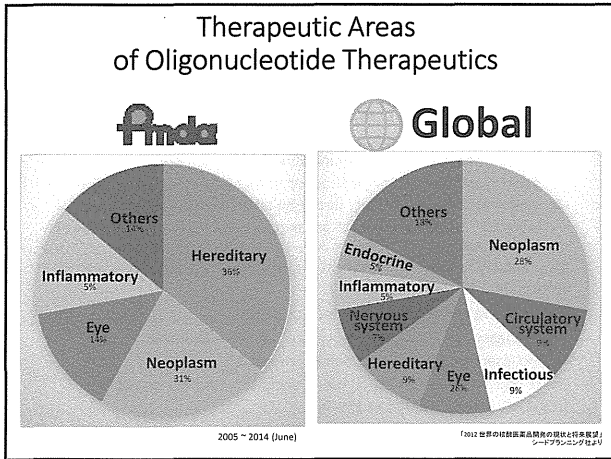
## Product Types of Oligonucleotide Therapeutics



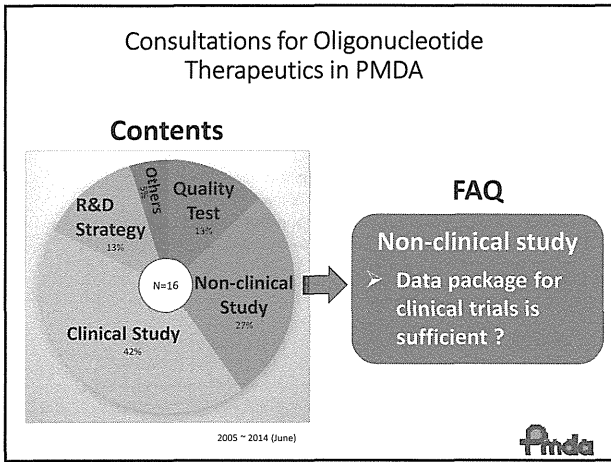
2005 ~ 2014 (June)



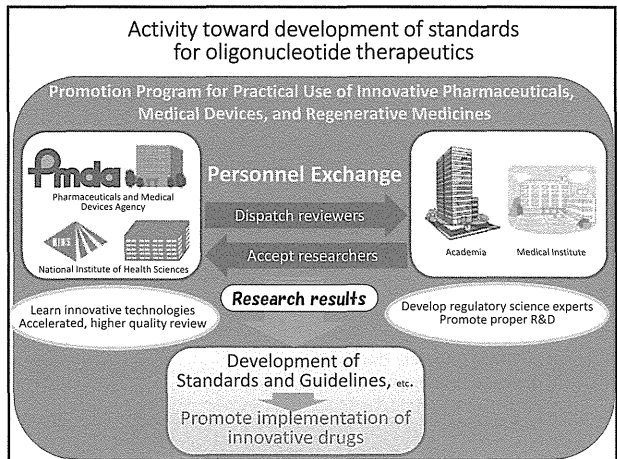
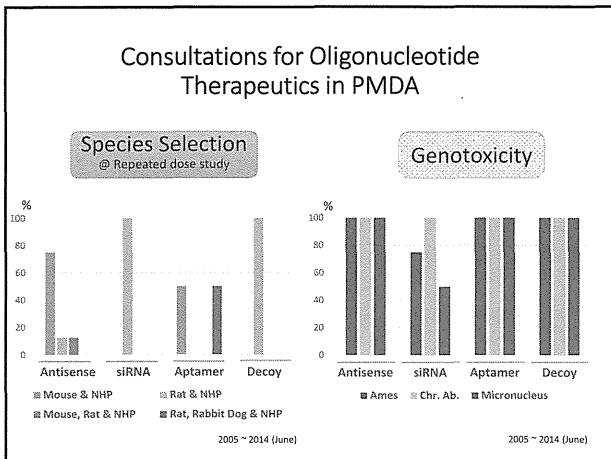
2012 世界主要国医薬品市場動向調査報告書  
リードドラッグレビュー



- ### Outline
- Introduction of PMDA
  - Review and Consultation for Oligonucleotide Therapeutics in PMDA
  - Present Issues



- ### Present Issues
- e.g.
- **Species Selection**
    - Choice of animal species
    - Use of surrogates
  - **Study Design**
    - High dose selection
    - Study duration
  - **Genotoxicity**
    - Relevancy of Standard genotox assessment
  - **Immunogenicity**
    - Extrapolation to humans
  - **Carcinogenicity**
    - Under what circumstances carc. studies would not be needed?
  - **Impurities**
    - Product-related impurities (e.g. n-1, n+1 mer)
- Appropriate Guidance to address the issues is awaited.**





**CURRENT CONCEPTS IN THE CHARACTERIZATION OF THE TOXICITY OF OLIGONUCLEOTIDE THERAPEUTICS**

AA Levin  
miRagen

### Oligonucleotides - Diversity and Similarity

- The structure and mechanism of action (MOA) varies among the oligonucleotides being considered for therapeutics
  - siRNA - double stranded; works through RISC
  - miRNA (mimetic) - double stranded; works through RISC
  - miRNA (antagonist) - single stranded; direct interaction with miRNA
  - Antisense - single stranded; direct inhibition of mRNA function
  - Aptamer - single stranded (often conjugated to PEG); direct interaction with protein
- The underlying intent is similar for the various classes -to target RNA to produce therapeutic activity
- These classes of oligonucleotides are drugs
- These classes of oligonucleotides are not gene therapy
  - No insertion, alteration or removal of genes
- Short hairpin RNAs (shRNAs) have promoters and are capable of insertion - these ARE gene therapy

46

### Disclaimers

The views and opinions expressed in the following PowerPoint slides are those of the individual presenter and should not be attributed to any other individuals or their sponsors.

When relevant, recommendations of the Oligonucleotide Safety Working Group (OSWG) are provided. These recommendations are for discussion purposes only and are not intended to describe the official position of OSWG, its subcommittees, or any individual participants or companies. Due to time and space limitations the recommendations have been summarized and may not accurately reflect the OSWG position.

This disclaimer is intended to provide information for context and not as a legal description

44

### Clinical and Nonclinical Experience with Oligonucleotides

- Estimated ~100 oligonucleotide-based drugs have been in clinical trials in Europe or the US
  - >50 antisense drugs
  - >20 siRNA
  - 3 microRNAs two anti-miRs - one miR-mimic
- Approximately 3000 human subjects have been treated
- Three oligonucleotides have been approved for human use
- Nonclinical studies to support these clinical trials and approvals have ranged from single dose to 1 yr toxicity studies in non-human primates and single to lifetime studies in rodents
  - >500 sequences in mice
  - ~25 sequences in non-human primates
- Multiple programs confirm this class of molecules can be transitioned from basic research to a commercial therapeutic
  - Current programs are expected to build on these achievements
  - Consistency among development programs and for regulatory expectations are key to future success

47

### OSWG - Scope and Focus

- OSWG is comprised of toxicologist and pharmacologist working in academia, industry, and regulatory agencies
  - Provides a forum for discussion of questions unique to oligonucleotides
  - To become a participant in OSWG - contact the OSWG administrative chair, Dr. Dave Schubert ([schubertdh@gmail.com](mailto:schubertdh@gmail.com))
- OSWG has identified key topics for discussion; subcommittee formed for each topic; changed or adjusted as appropriate
  - CMC of oligonucleotides
  - Genotoxicity
  - Reproductive Toxicology/Carcinogenicity
  - Inhaled oligonucleotides
  - Immunomodulatory
  - hERG Testing/Safety Pharmacology
  - Exaggerated pharmacology
  - Off-target effects
  - Formulations

45

### Potential Issues for Oligo Therapeutics Raised in the FDA Review of Mipomersen

- Hepatic/Renal
- Pro-inflammatory effects
- Complement Activation/Vascular changes
- Carcinogenicity
- Immunogenicity
- Pharmacokinetics

➤ Missing from this list are off-target effects- why is that?

### Hepatic and Renal Issues Clinical Findings

- Hepatic findings
  - ALT increases in clinical trials > 3x ULN (16%) with correlations to liver fat (MRI)
  - Changes appear to be related to inhibition of apoB and unrelated to ASO chemistry
- Renal findings
  - Reported increase in urine protein
  - Significance of increase was unclear:
    - Not present in HoFH population
    - Urine dipstick values in pooled Phase 3 was higher than baseline but near the value from PBO at baseline
    - Quantitative mean values in pooled phase 3 were high, but median values were unchanged
  - No industry wide - issues here but data are available that renal monitoring is critical - Santaris SPC-5001 and Prosensa PRO051 clinical finding and non clinical studies

### Complement Activation and Vascular Changes

- Clinical findings
  - No increase in complement split products (C5a and Bb) at any dose or route in the clinical trials
- Non-clinical findings
  - Complement activation was apparent in monkeys at 5C doses of > 20 mg/kg (-7x clinical exposure)
  - Monkeys had intimal thickening/hyperplasia with lymphocytic infiltration
    - Vascular changes were associated with reductions in circulating complement C3. Potential reductions in Complement function and the clearance of immune complexes might result in such lesions.

### Pro-inflammatory Effects

- Clinical Findings
  - Injection site reactions and Transient Flu-like symptoms were common reported AEs
  - “FLS do not seem to correlate with changes in plasma cytokines (IL-1a, IL-13, IL-6, interferon alpha or beta) or chemokines (MCP-1 and MIP- 1a) “
- Comments
  - No new issues were raised
  - ISR and FLS were patient retention issues, ~10% of discontinuations in Phase 3
  - Continued need for animal models of the conditions to allow for better screening

### Complement Activation and Vascular Changes (continued)

- Comments
  - The FDA reviewer accepted the proposed mechanism of action in this case and the association with complement activation suggests species specificity.
    - This hypothesis may still be challenged by other reviewers in the future
  - Very important to properly design chronic monkey studies with appropriate endpoints and disciplined interpretation with supportive data for a mechanism
  - Are there specific experimental approaches that should be examined to test the hypothesis?
  - LIKE THE IMMUNOSTIMULATION IN RODENTS THIS TOXICITY APPEARS TO BE OVERPREDICTED BY MONKEY STUDIES- RAISING THE MORE IMPORTANT ISSUE OF INTERSPECIES PREDICTABILITY

53

### Antigenicity

- Clinical Findings
  - Observation of high incidence of positive immunogenicity samples
  - Correlated with high plasma ASO trough concentration
  - No effect on safety or efficacy parameters other than slight correlation with FLS
- Comments
  - Nature of this immunogenicity signal is unclear
  - This needs to be addressed in later stages of development for other ON programs
  - Need to consider the specificity of interaction
    - Known polyclonal Ig response and nonspecific protein binding of ASO

### Carcinogenicity

- Clinical findings
  - Incidence rate of malignant neoplasm in -treated patients is comparable to expected range for a similar patient population
  - Imbalance between PBO and treated patients likely triggered the presentation to Ad Comm
- Non-clinical findings
  - assessed in 2-year carcinogenicity studies in mice and rats.
    - Mice- increased incidence of benign hepatocellular adenoma in female mice treated with either 60 mg/kg/week ISIS 147764 or 60 mg/kg/week mipomersen.
    - Rats/mice- malignant fibrous histiocytoma and malignant fibrosarcoma in skin at Inj. site

### Carcinogenicity

- Comments
  - *Two full studies were required though the standard is one and an alternative test should try to challenge the two species issue in the future*
  - Positive findings were addressed prudently.
    - Chronic inflammation at the injection sites in rodents was associated with a sarcoma but that is known to be rodent specific and are rare in humans
    - Liver adenomas in mice reflect the known sensitivity of mice to liver tumors and the sensitivity of mice to proinflammatory effects of ASO
  - Observed tumor types are frequently observed in the test species with ready explanations. They not rare tumors that would have suggested some unique processes
  - Body Surface Area Allometric scaling applied by FDA is not well supported by data (Addressed later)
  - No real evidence of meaningful cancer risk evident in data

### Pharmacokinetic Scaling

This was discussed at DIA/FDA Workshop

- The conclusion drawn is dose/surface area is a better predictor reducing apparent safety margins
- However, plasma AUC and equilibrium plasma concentrations (trough conc) are nearly identical from monkey to man with equivalent doses on a mg/kg basis for multiple drugs and multiple chemistries.
- Comment
  - Reconciling the above data and the trough plasma concentrations is difficult.
  - Would be best to use empirically measured values to set margins, such as plasma AUC
  - Need to Challenge the use of BSA as Plasma exposures between man and monkey (and to a lesser extent rat) appear to be better extrapolated on the basis of body weight rather than surface area.
  - This issue needs to be addressed with a position paper from the OSWG

### Issues NOT raised in the mipomersen review - being raised in other regulatory interactions

- Genotox- seems to be fading as an issue
- Off-target effects are being raised and are being answered with in silico data
- Surrogate drugs- being accepted when necessary? 1 species exaggerated pharm?
- The field is expanding into new indications with specialized routes of admin and formulations
- Additional issues related to route of exposure and formulations are gaining prominence
  - Route effects maybe generalizable
  - Formulation effects are may be more proprietary, though an OSWG panel is working on this

厚生労働科学研究費補助金（医薬品等規制調和・評価研究事業）  
平成26年度分担研究報告書

－発生毒性試験の代替法に関する研究－

研究分担者：堀本 政夫（千葉科学大学 教授（2014年9月～））  
代田眞理子（麻布大学 教授（～2014年5月））  
研究協力者：真木 一茂（独立行政法人 医薬品医療機器総合機構）  
関澤 信一（独立行政法人 医薬品医療機器総合機構）  
甘粕 晃平（独立行政法人 医薬品医療機器総合機構）  
藤原 道夫（アステラス製薬株式会社）  
三分一所 厚司（第一三共株式会社）  
渡部 一人（中外製薬株式会社）  
代田眞理子（麻布大学 教授（2014年6月～））

研究要旨

本研究は、従来の発生毒性試験の代替法として考案された種々の試験法に関する現状を調査して、代替法としての有用性および課題を明らかにし、それに伴うICH生殖発生毒性試験法ガイドライン（S5（R2））の改定の必要性について検討した。日米EUでの代替法の基礎情報に関する調査に基づいて議論した結果、代替法として開発された*in vitro*、*ex vivo*、非哺乳類*in vivo*試験などは、現状では単独で哺乳類の発生毒性試験に置き換えることは困難であるが、これらの試験を組み合わせることや胚・胎児発生に関する予備試験の活用などで発生毒性のリスク評価を、一定程度行える可能性が示唆された。これらの検討結果を踏まえ、S5（R2）ガイドラインの全面改定の必要性と改定に際し「解決すべき課題」と「検討すべき事項」を明らかにした。

キーワード：発生毒性試験、ICH S5ガイドライン、代替法

A. 研究目的

ICH生殖発生毒性試験法ガイドライン（S5（R2））が作成されて、15年以上が経過している。この間、科学技術の進歩等により従来の生殖発生毒性試験法に代わる試験として種々の代替法が考案され、その実施経験も蓄積されてきた。本研究の目的は、独立行政法人 医薬品医療機器総合機構および日本製薬工業協会（以下、「JPMA」）などから研究協力者の参加を得て、発生毒性試験の代替法に関する現状を調査し、代替法としての有用性および課題を明らかにすること、また、ICH S5（R2）ガイドラインの改

定の必要性について検討することである。

B. 研究方法

今年度は、下記に示す4回の分担研究班会議と2回のInformal Working Group会議（ミネアポリス、リスボン）を通して、*in vitro*、*ex vivo*、非哺乳類*in vivo*試験等の代替法としての有用性と課題、ICH S5（R2）ガイドラインの改定について議論した。

1. 第1回分担研究班会議（平成26年5月29日）
2. ICHミネアポリス会議（平成26年6月2日～6月5日）

3. 第2回分担研究班会議（平成26年11月4日）
4. ICHリスボン会議（平成26年11月10日～11月14日）
5. 第3回分担研究班会議（平成26年11月27日）
6. 第4回分担研究班会議（平成27年2月26日）

## C. 研究結果

### 1. ICHミネアポリス会議前

ICHミネアポリス会議において、ICH S5 (R2) 生殖発生毒性試験ガイドライン改定に関するInformal Working Group会議が開催されることが決定し、それを受けて本研究班において発生毒性評価に関わる代替法の現状とガイドラインの見直しについて意見交換を行った（第1回分担研究班会議）。

### 2. ICHミネアポリス会議

S5 Informal Working Group会議では、①試験法のアップデート、②胚・胎児発生に関する試験、③代替法の3項目を中心に議論した。

#### ①試験法のアップデートについて

I、II、III試験に関する試験法の見直し、他のICHガイドライン（M3 (R2)、S6 (R1)、S9）との整合性についての議論を踏まえ、現行のS5 (R2) ガイドラインの全面改定を前提としたExpert Working Group (EWG) での議論が必要であるとの見解で一致した。

#### ②胚・胎児発生に関する試験について

胚・胎児発生に関する試験は発生毒性を評価する上で重要な試験であり、2種の動物種（通常、ラットとウサギ）を用いることの必要性や試験数削減の可能性について議論した。その結果、現時点で一律に動物種を削減することは困難であるが、胚・胎児発生に関する予備試験等の導入により本試験を省略できる可能性が示唆され、EWGを設立して議論する必要があるとの見解で一致した。

#### ③代替法について

従来の生殖発生毒性試験の代替試験として考えられている、マウスおよびヒト胚性幹細胞を用いた試験 (EST)、ラットを用いた全胚培養 (WEC)、ゼブラフィッシュを用いた試験（非哺乳類*in vivo*）

に関する調査結果が報告された。その報告に基づいて議論した結果、単独の試験のみでは従来の*in vivo*試験の結果を予測することは困難であったが、これらの複数の試験を組み合わせることにより、発生毒性のリスクを予測できる可能性が示唆されたことから、代替法の有用性を検証するためにEWGにおいて、各企業が所有しているデータを収集して精査する必要があるとの見解で一致した。

上記の議論を踏まえ、Steering Committee (SC) に対してS5 Informal Working GroupとしてEWGの設立とガイドラインの改定を提案した。しかし、代替法に関するデータ等の収集・解析の必要性があるとの理由によりEWGの設立は見送られた。

### 3. ICHリスボン会議前

SC電話会議において、リスボンでのS5 Informal Working Group会議の開催決定を受けて、グループリーダーより各極における代替法に関する基礎情報を収集するよう要請があり、JPMAによる代替法の国内利用状況に関するアンケート調査を行った。アンケート調査から得られた知見は以下のように要約され、この結果をリスボン会議で発表することを確認した（第2回分担研究班会議）。

- 代替法（EST、WEC、ゼブラフィッシュを用いた試験）の実施経験があるのは45社中14社、31%であった。
- 31社（69%）は実施経験がなかった。
- 実施しない理由としては、試験の信頼性に対する懸念、リソース不足等が挙げられた。
- 実施経験のある会社によれば、動物実験の結果との一致性は、70～89%との回答であり、文献情報等とは大きな隔たりは認められなかった。

### 4. ICHリスボン会議

S5 Informal Working Group会議では、主に①S5 (R2) ガイドライン改定に際して「解決すべき課題」の特定、②「検討すべき事項」についての討議を行った。

①ICH S5 (R2) ガイドライン改定に際して「解決すべき課題」として下記の4項目を特定した。

- ◇用量設定に関する、ヒト曝露量との適切な「安全係数」および他のエンドポイント
  - ◇ヒトに対するリスク評価を考慮した「動物種選択のクライテリア」の合意
  - ◇規制当局に受け入れられる*in vivo*、*ex vivo*、非哺乳類*in vivo*試験のための「performance criteria」の設定
  - ◇胚・胎児発生に関する試験と*in vivo*、*ex vivo*、非哺乳類*in vivo*試験を組み合わせる場合の「試験戦略」およびその試験戦略が「規制当局に受け入れられる条件」
- ②ICH R5 (R2) ガイドライン改定に際して「検討すべき事項」として下記の5項目について討議した。
- ◇他のICHガイドラインとの整合性
  - ◇ヒトでの曝露を考慮したリスク評価
  - ◇試験の組み合わせやデザインのオプションの拡大
  - ◇科学の進歩に基づいた評価法の検討
  - ◇胚・胎児発生に関する試験の予備試験の活用および内容
- 討議の結果、改定すべき箇所が現行のガイドライン全体に及ぶこと等の理由により、改定するには全面改定をする必要があるとの見解で合意した。
- 上記の議論を踏まえ、SCに対してEWGの設立と現行ガイドラインの全面改定を提案した。しかし、FDAが全面改定については持ち帰り検討が必要と表明し、ICHリスボン会議でのEWGの設立は見送られた。

## 5. ICHリスボン会議後

分担研究班のメンバー間での情報共有のためにICHリスボン会議で討議された内容を報告するとともに、EWG化に向けた対応として、今後SCでガイドラインの全面改定が承認されない場合にはaddendumでの対応でも考慮することを確認した（第3回分担研究班会議）。また、ガイドライン改定の際に日本側の意見を反映させるべく、研究班において取り組むべき検討課題について議論した（第4回分担研究班会議）。

## D. 考察

当初本研究は、「従来の2種の動物を用いた発生毒性試験を見直して、*in vitro*、非哺乳類*in vivo*試験等の代替法を活用して動物種を減らすことはできないか」という議論から始まったが、代替法に関する現状調査、2回のICH会議（Informal Working Group）での議論を経て、現状では代替法により一律にウサギ試験を廃止することは困難であるとの結論に達し、S5ガイドラインの改定に関するConcept Paperの骨子が大きく変わった。すなわち、発生毒性試験の代替法の利用に限らず、他のICHガイドラインとの整合性や予備試験の活用など、現行ガイドラインの全面改定を前提とした改定が必要と考えられる項目について、以下のように整理された。

- 他のICHガイドライン（S6（R1）、M3（R2）、S9）との整合性
  - ▶胚・胎児発生に関する試験について、他のガイドラインにはそれぞれの観点から記載されているが、それらを統合した記載にすること
  - ▶他のガイドラインで推奨されるアプローチをICH S5ガイドラインにも適用すること
- ヒトでの曝露を考慮したリスク評価
  - ▶ICH M3（R2）ガイドラインの反復投与試験で示されているのと同様に、ヒトの曝露量に対する安全係数や薬理作用などのエンドポイントによって最高用量を設定すること
  - ▶ヒトのリスク評価を考慮した動物種を選択すること
- 試験の組み合わせやデザインのオプションの拡大
  - ▶各安全性試験の柔軟な組み合わせを検討すること
- 科学の進歩に基づいた評価法の検討
  - ▶妊娠動物における被験物質の曝露評価を導入すること
  - ▶ラット出生児での行動観察項目を見直すこと
- 胚・胎児発生に関する試験の予備試験の活用
  - ▶胚・胎児発生に関する最終的なリスク評価が可能な条件を明らかにすること
- 代替法の利用
  - ▶*In vitro*、*ex vivo*、非哺乳類*in vivo*試験が規制当局

に受入れられるための条件等を提供すること

## E. 結論

発生毒性試験の代替法として開発された*in vitro*、*ex vivo*、非哺乳類*in vivo*試験などの日米EUにおける現状に基づいて議論した結果、これらの代替法は単独で哺乳類の発生毒性試験に置き換えることは難しいが、当該試験を組み合わせることや胚・胎児発生に関する予備試験の活用などにより、発生毒性のリスク評価を行える可能性が示唆された。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Makoto Ema, Katsumi Endoh, Ryou Fukushima, Sakiko Fujii, Hiroaki Hara, Mutsuko Hirata-Koizumi, Akihiko Hirose, Hitoshi Hojo, Masao Horimoto, Nobuhito Hoshino, Yoshinori Hosokawa, Yukari Imai, Hiroshi Inada, Kunifumi Inawaka, Keiichi Itoh, Yoshihiro Katsumata, Hiroyuki Izumi, Hirohito Kato, Maki Maeda, Kiyoshi Matsumoto, Seiki Matsuo, Toshiki

Matsuoka, Ikuo Matsuura, Hiroshi Mineshima, Yoji Miwa, Nao Nakano, Masato Naya, Hiroko Noyori, Takafumi Ohta, Harutaka Oku, Atsushi Ono, Tatsuya Shimizu, Kazuhiro Shimomura, Ikuro Takakura, Ryota Tanaka, Taishi Tateishi, Yuko Tominaga, Tohru Uesugi, Chizuru Urakawa, Kaoru Yabe, Akihito Yamashita, Toshiaki Yamaguchi, Ryohei Yokoi : Historical control data on developmental toxicity studies in rodents, *Congenital Anomalies*, 2014, 54: 150-161.

### 2. 学会発表

堀本政夫, 濱嶋藍里, 水橋美保, 土谷展子, 堀籠由希 : フルシトシンで誘発されるラット骨格異常について、2014年、第41回日本毒性学会

野崎裕美, 横谷 亮, 佐々木 啓, 伊藤浩太, 奥村佳奈子, 中山拓生, 石川典子, 古川正敏, 平田真理子, 堀本政夫, 松浦正男 : 新規食餌性肥満動物モデルとしての有用性に関する検討II、2014年、第41回日本毒性学会

## H. 知的財産権所有権の出願・登録状況

該当なし

医薬品・医療機器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  
国際調和の推進にかかわる研究

平成26年度班会議

平成 27 年 1 月 13 日(火)

@国立医薬品食品衛生研究所

1

発生毒性試験の代替法に関する研究

千葉科学大学 危機管理学部  
動物危機管理学科

堀本 政夫

2

発生毒性試験の代替法に関する研究

研究分担者 代田真理子(麻布大学) ~平成26年5月  
堀本 政夫(千葉科学大学) 平成26年6月~

研究協力者 真木 一茂(医薬品医療機器総合機構)  
関澤 信一(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)  
藤原 道夫(製薬協、アステラス製薬)  
三分一 厚司(製薬協、第一三共)  
渡部 一人(製薬協、中外製薬)  
代田真理子(麻布大学) 平成26年6月~

オブザーバー 篠田 和俊(医薬品医療機器総合機構)

3

発生毒性試験の代替法に関する研究

研究目的

ICH生殖発生毒性試験法ガイドライン(S5(R2))が作成されて、15年以上が経過している。その間、科学技術の進歩等により、従来の生殖発生毒性試験法に代わる試験として、種々の代替法が考案され、その実施経験も蓄積されてきた。

本研究では①発生毒性試験の代替法に関する現状を調査し、代替法としての有用性と課題を明らかにすること、②ICH S5 (R2) ガイドラインの改訂の必要性と改訂に際して③検討すべき事項を明らかにすることである。

4

分担研究班の活動(H26年度)

- 第1回分担研究班会議(2014年5月29日)
  - ✓発生毒性評価の代替法とS5(R2)ガイドラインの改訂に関する意見交換
- Informal Working Group ミネアポリス対面会議(2014年6月2~5日)
  - ✓発生毒性評価における代替法の位置づけの議論
  - ✓代替法データの収集に時間を要するとしてEWGの設立は見送り
- 第2回分担研究班会議(2014年11月4日)
  - ✓JPMAIによる代替法の利用状況に関する現状調査結果に基づく議論
- Informal Working Group リスボン対面会議(2014年11月10~14日)
  - ✓S5(R2)の改訂の必要性の議論と全改訂を前提としたEWG設立をscへ提案
- 第3回分担研究班会議(2014年11月27日)
  - ✓EWG化への対応と分担研究班で検討すべき課題に関する議論
- 第4回分担研究班会議(2015年2月26日 予定)
  - リスボン会議以降の進捗報告、EWG化後の課題に関する検討

5

ミネアポリス会議以後の活動 (第2回分担研究班会議前)

- 各パーティーに対して代替法に関する基礎情報の収集要請
  - ✓実施状況
  - ✓使用試験系(ゼブラ, EST, WEC, in silico 等)
  - ✓系の組み合わせ戦略
  - ✓陽性、陰性対照物質のデータ収集状況
  - ✓動物実験データに対する的中率
  - ✓曝露量設定方法 など
- 要請を受けてJPMA加盟企業に対してアンケートを実施(2014年9~10月)

6



第2回分担研究班会議 (1/2) (2014年11月4日)

1. Informal Working Group ミネアポリス対面会議での論点整理
  - S5 (R2)GL改訂のためのコンセプトペーパー骨子の調整と修正
    - 試験法のUp-date
    - ウサギ胚・胎児発生に関する試験(発生毒性試験)の省略・簡略化
    - 胚・胎児発生毒性評価における代替法の位置づけに関する議論
    - Steering CommitteeによるEWG化は見送り
      - ゼブラフィッシュ・EST・WEC等の代替法に関する更なる情報収集・解析の必要性あり、FDAがEWG化への態度保留等の理由
2. Informal Working Group リスボン対面会議に向けての討議
  - EWG化への対応
    - 前回会議での論点が盛り込まれるのであれば、EWG化へ同意することを確認

7

第2回分担研究班会議 (2/2) (2014年11月4日)

3. JPMAアンケート結果報告
  - JPMAによる代替法に関する基礎情報調査(現状調査)
    - 代替法(ゼブラ、EST、WEC)の実施経験あり(14/45社、31%)
    - 31/45社(69%)は実施経験なし
    - 実施しない理由として、試験の信頼性に対する問題、リソース不足等が挙げられる
    - 実施経験のある社によると、動物実験の結果との一致性は70~89%との回答で、文献情報等とは大きな隔たりはなかった
  - 上記のアンケート結果をリスボン会議で発表することを確認

8

ICH S5 Informal Working Group メンバー October 27, 2014

- **EU:** Sonja Beken, Jan Willem van der Laan
- **EFPIA:** Steven Spanhaak, Jane Stewart, Anthony DeLise
- **MHLW/PMDA:** Masao Horimoto, Kazushige Maki, Shin-ichi Sekizawa, (Takahiro Goto)
- **JPMA:** Michio Fujiwara, Atsushi Sanbuissho, Kazuto Watanabe
- **FDA:** Abigail Jacobs, Martin (Dave) Green
- **PhRMA:** Joseph DeGeorge, Mary Ellen Mc Nerney, Paul Andrews

9

Informal Working Group リスボン対面会議 (2014年11月10~14日)

Informal Working Group メンバーによる討議

- S5(R2)ガイドライン改訂に際して「解決すべき課題」の特定
- Draft Concept Paperの改訂(検討すべき事項の討議)
  1. 他のガイドラインとの整合性
  2. ヒトの曝露を考慮したリスク評価
  3. 試験の柔軟な組み合わせ
  4. 科学の進歩に基づいた推奨技術
  5. 胚・胎児発生に関する試験の予備試験の洗練
  6. 代替法の利用
- S5(R2)ガイドライン(GL)の全面改訂の必要性があるとの見解で合意
  - 改訂すべきポイントがGL全体に及ぶこと等の理由
- Steering Committeeに対してGL全改訂を提案
- SCによるEWG化は見送り
  - FDAがGL全面改訂には持ち帰って再検討が必要との理由

10

ICH S5(R2) ガイドライン改訂に向けてのコンセプトペーパー骨子の変遷

2014年1月 EU作成  
(1)ウサギ試験の廃止  
(2)代替法の採用

2014年6月 ミネアポリス会議  
(1)EFD試験への代替法組込み  
(2)それ以外の一般的事項

2014年11月 リスボン会議  
(1)他のガイドラインとの整合性  
(2)ヒトでの曝露を考慮したリスク評価  
(3)試験の組み合わせの拡大  
(4)科学の進歩に基づいた評価法  
(5)EFD予備試験の活用  
(6)代替法の利用

リスボン対面会議 (1/6)

S5(R2)ガイドライン改訂に際して「解決すべき課題」

- 用量設定に関して、ヒト曝露量との適切な「安全係数」および他のエンドポイントについての合意
- ヒトに対するリスク評価を考慮した「動物種選択のクライテリア」の合意
- 規制当局に受け入れられる in vitro, ex vivo, 非哺乳類の in vivo試験のための「performance criteria」の設定
- 胚・胎児発生に関する試験(EFD試験)と in vitro, ex vivo, 非哺乳類 in vivo試験を組み合わせる場合の「試験戦略」およびその試験戦略が「規制当局に受け入れられる条件」

12



### 第3回分担研究班会議 (2014年11月27日)

1. ICH リスボン会議の報告
  - Informal Working Group メンバーによる討議
    - S5(R2)ガイドライン(GL)の全面改訂の必要性があるとの見解で合意(改訂すべきポイントがGL全体に及ぶこと等の理由)
  - Draft Concept Paperの改訂
  - Steering CommitteeによるEWG化は見送り
    - FDAがGL全面改訂には持ち帰って再検討が必要との理由
2. 今後の分担研究班活動について
  - EWG化への対応
    - ICH S5(R2)GLの全面改訂が必要と考えるが、FDAが全面改訂に同意できないとする場合は addendumでの対応でも同意することを確認
  - 分担研究班で検討すべき課題について
    - EWG化が承認された場合に日本の意見を反映させるべく、研究班で検討しておくべき課題について討議(第4回会議で継続予定)

19

### ICH S5(R2)ガイドライン改訂に向けた今後の予定

- FDAが持ち帰り、収集したデータのレビューを希望
- コンセプトペーパー承認は保留
- EWG設立の可否は次回のSC電話会議で判断(2015年3月予定)



#### ICH S5(R3) EWG Work Plan (EWGが設立された場合)

- ・ 電話会議等により作業開始 (2015年 第1四半期)
- ・ 対面会議 (2015年 6月)
- ・ Step 2 合意 (2017年 7月)
- ・ パブリックコメント
- ・ Step 4 合意 (EWG設立から4.5年) (2019年 7月)

20

厚生労働科学研究費補助金（医薬品等規制調和・評価研究事業）  
平成26年度分担研究報告書

## －薬物相互作用評価に関する研究－

研究分担者：斎藤 嘉朗（国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部）

### 研究要旨

昨年度までに作成した「医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン案」を修正し、最終案としての事務連絡発出に貢献した。最終案をまとめるにあたり、関連団体から寄せられたコメントを集約して内容を検討すると共に、意見に基づいたQ&A一次案の作成を並行して行った。また国際的な調和が行われていない項目に関し、米国FDAの担当官との意見交換を行った。さらに、ICH S3A「トキシコキネティクスに関するガイダンス」におけるマイクロサンプリングに関するQ&A作成のトピック化に伴い、国内 implementation working group メンバーを中心として一次案の作成を行った。

キーワード：薬物動態、相互作用、代謝酵素、トランスポーター、マイクロサンプリング

### 研究協力者

表にリストとして掲載した。

#### A. 研究目的

##### 1) 薬物相互作用評価・添付文書反映に関する日本のガイドライン改定

医薬品が併用された場合、薬物動態学的な相互作用により血中等の濃度が上昇し副作用発現に至る場合や、逆にその濃度低下により薬効の低下に至る場合がある。また、薬力学的な相互作用により薬効や副作用に影響が現れることもある。このような薬物相互作用に関し、医薬品開発時の検討方針を定めた行政指針が、平成13年6月4日に、厚生労働省医薬局審査管理課長通知「薬物相互作用の検討方法について（医薬審発第813号）」として発出された。策定当時としては、最新の知見を取り入れた国際的にも先進的な指針であったが、既に10年以上が経過し、新たな科学的知見が多く蓄積したことにより、効率的な医薬品開発や薬物相互作用を踏まえた適正使用を推進する上で不十分となってきた。一方、米国食品医薬品庁（FDA）では薬物相互作用に関する新し

いガイダンス案を平成18年に発表しており、さらにその詳細な改正案を平成24年2月に発表した。また欧州医薬品庁（EMA）でも平成24年6月に薬物相互作用に関する新ガイドラインを発表し、平成25年1月から適用が開始された。これらは、薬物動態を制御するトランスポーターに関する試験、薬物動態モデルに基づくシミュレーションによる予測、定量的指標に基づく決定樹による必要な試験内容の判断、生物製品と化学医薬品との相互作用など、最新の知見を反映した詳細なものとなっている。これらの状況に鑑み、本邦でも早急に新しい指針の策定のための検討を行う必要があると考えられた。また、米国の新しいガイダンス案では、相互作用を生ずる機構で薬物動態学的に関係する医薬品を適切に分類し、グループごとに注意喚起する方法論が取り入れられているように、より安全な薬物治療を患者に提供するための情報の示し方も検討する必要がある。

そこで、昨年度までに新規ガイダンスの素案を作成し、さらに記載内容や表現に関する検討を行ってパブリックコメント募集に供し、その意見に基づきガイドライン案の修正を行った。