

第23回 日本毒科学学会学術年会  
第5回 日本毒科学会サテライトシンポジウム

毒性試験の国際化と今後の課題  
プログラム・予報集

平成8年7月24日(水)

九州大学薬学部  
1996 福岡

# 第23回 日本毒科学会学術年会 第5回日本毒科学会サテライトシンポジウム

## 毒性試験の国際化と今後の課題

会期： 平成8年7月24日（水）

会場： 電気ビルA会場（福岡市中央区渡辺通り1丁目）

### 第5回 サテライトシンポジウム企画委員

委員長	五十嵐俊二	エーザイ 東京研究所
副委員長	小栗 一太	九州大学 薬学部
	黒川 雄二	国立衛生試験所安全性生物試験研究センター

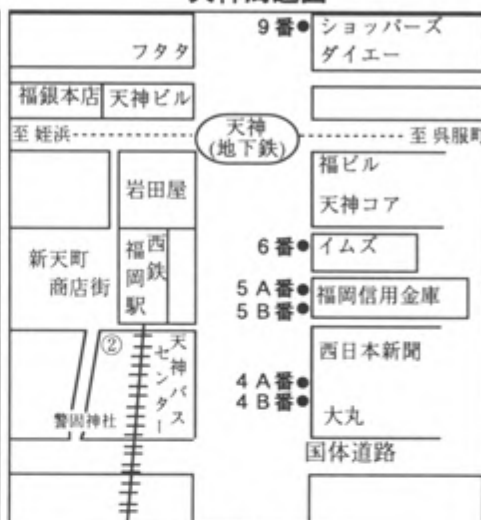
委員	井上 達	国立衛生試験所 毒性部
	遠藤 仁	杏林大学 医学部
	大野 泰雄	国立衛生試験所 薬理部
	小野 宏	食品薬品安全センター 秦野研究所
	鎌滝 哲也	北海道大学 薬学部
	祖父尼俊雄	国立衛生試験所 変異遺伝部
	高橋 道人	国立衛生試験所 病理部
	堀井 郁夫	日本ロシュ 研究所毒性病理部
	松澤 利明	山之内製薬 創薬安全性研究所
	増田 裕	三共 総合研究所
	馬屋原 宏	武田薬品工業 薬剤安全性研究所
	三沢 馨	厚生省 薬務局審査課
	柳田 知司	前臨床医学研究所

学会事務局： 石井 裕次  
〒812-82 福岡市東区馬出3-1-1  
九州大学薬学部衛生化学・裁判化学教室  
電話：092-641-1151 内線6138  
FAX：092-641-8154（薬学部）

J R博多駅周辺図



天神周辺図



●印はバスのりば

交通

A. 福岡空港、博多駅より

(1) 地下鉄 福岡空港 駅より、「姪浜」方面行の電車に乗車、地下鉄博多駅にて下車。4～8分間隔で運行。所要時間5分、料金220円。

地上に出て、J R博多駅博多口側にある3番バスのりばからバスに乗車、渡辺通り1丁目バス停にて下車。1～2分間隔で運行。料金170円、所要時間約10分。

(2) 地下鉄 福岡空港 駅あるいは地下鉄博多駅より、「姪浜」方面行の電車に乗車、地下鉄天神駅にて下車。4～8分間隔で運行。所要時間6～11分、料金220円。

天神よりバスに乗車、渡辺通り1丁目バス停にて下車。5～8分間隔で運行。料金170円、所要時間5～7分。バスのりばおよび系統番号は、4 A 番 (系統番号25)、4 B 番 (系統番号49, 62)、5 A 番 (系統番号61, 55, 153)、5 B 番 (系統番号60, 63)、6 番 (系統番号20, 25, 44, 45, 45-1, 85) および9 番 (系統番号25, 44, 45, 45-1, 61, 62, 63, 49, 85, 153) です。

B. 天神よりバスの利用 (所要時間は時間帯で変わります。)

上記Aの(2)に従ってバスに乗車、渡辺通り1丁目バス停にて下車。5～8分間隔で運行。料金170円、所要時間5～7分。

C. 天神より徒歩

天神、福ビル前より徒歩で約20分

D. タクシー利用の場合 (所要時間および料金は時間帯で変わります。)

1. 福岡空港～電気ビル前 約2,000円 (約15分)
2. J R博多駅～電気ビル前 約700円 (約5分)
3. 天神～電気ビル前 約700円 (約5分)

# 会場案内図



- ① ホテルニューオータニ      ⑤ セントラルホテル福岡
- ② ソラリア西鉄ホテル      ⑥ 福岡東映ホテル
- ③ ホテルセントラーザ      ⑦ サンライフホテル
- ④ 福岡ビューホテル      ⑧ グリーンホテル

# 目次

	頁
開会の挨拶 (9:00-9:20)	1
司会 小栗 一太 (九大・薬)	
毒性試験の国際化と今後の課題	1
五十嵐俊二 (エーザイ)	
ガイドラインの解釈における国際調和	仲庭 裕司 (厚生省薬務局)
セッション1 (9:20-10:20)	
単回・反復毒性試験	2
司会 小野 宏 (食薬安全センター)、松澤 利明 (山之内製薬)	
単回投与毒性試験の問題点	3
橋本 正晴 (藤沢薬品)	
イヌ長期反復投与毒性試験の期間は6、12それとも9カ月?	5
門田 利人 (フリストル・マイヤーズ・スクイフ)	
無毒性及び毒性用量に関する事例研究	7
苗代 一郎 (武田薬品工業)	
セッション2 (10:20-11:20)	
生殖発生毒性試験	9
司会 川島 邦夫 (国立衛試)、高山 敏 (埼玉第一製薬)	
ICHガイドラインの実践とその所感	10
赤池 雅司 (ヘキストジャパン)、他	
事例：生殖発生毒性試験のStandard protocols	13
堀本 政夫 (ファイザー製薬)	
Assessment of Male Reproductive Toxicity in Rats Under ICH Guidelines	16
M. A. Cukierski (Merck Research Laboratories)	
セッション3 (11:20-12:00)	
遺伝毒性試験	18
司会 祖父尼俊雄 (国立衛試)、島田 弘康 (第一製薬)	
ICHガイドラインで遺伝毒性試験はどう変わるか?	19
祖父尼俊雄 (国立衛試)	
試験結果の評価と追加試験の選択に関するケース・スタディ	20
降旗 千恵 (東大・医科研)	
試験の標準セットの論議の焦点は?	23
島田 弘康 (第一製薬)	
昼食休憩 (12:00-13:00)	

<b>セッション4 (13:00-14:00)</b>		
がん原性試験	司会 高橋 道人 (国立衛試)、増田 裕 (三共)	26
がん原性試験に用いる動物種	白居 敏仁 (ヤンセン協和)、他	27
トランスジェニック動物による発癌性評価	三森 国敏 (国立衛試)、他	29
Initiation-Promotion Modelによる発癌性の評価	今井田克己 (名古屋市大)、他	31
Initiation-Promotion Modelによる評価の事例	務台 衛 (三菱製薬)、他	34
今後の問題点	高橋道人 (国立衛試)、他	36
<b>セッション5 (14:00-15:15)</b>		
トキシコキネティクスと反復投与組織分布試験	司会 大野泰雄 (国立衛試)、堀井 郁夫 (日本ロシユ)	37
試験デザインと統計解析：製薬協事例データベースの紹介	五十嵐俊二 (エーザイ)、他	38
GLP下での運用と分析バリデーションの問題点	杠 輝昭 (エーザイ)、他	45
TKへの期待とその展望：ヒト副作用の予測を目指したTK	杉山 雄一 (東大・薬)、他	48
ICHガイドライン“反復投与組織分布試験ガイドライン”の概要と問題点	粟津荘司 (東京薬科大学)、他	52
単回投与組織分布試験から反復投与時の蓄積性の予測が可能か？	溝尻 顕爾 (塩野義製薬)、他	55
<b>休憩 (15:15-15:30)</b>		
<b>セッション6 (15:30-16:20)</b>		
バイオ医薬品の安全性試験	司会 井上 達 (国立衛試)、牧 栄二 (ヤンセン協和)	61
安全性試験の基本的な考え方と事例紹介	牧 栄二 (ヤンセン協和)	62
PK/TK試験の問題点と事例紹介	河合 睦文 (日本イーライリリ)	64
バイオ医薬品の特殊性と今後のICH S6	高木 篤也 (国立衛試)	66
新しい安全性評価法への挑戦：トランスジェニック/免疫不全マウス作成の経験	上山 義人 (東海大・医)	67
<b>閉会の挨拶 (16:20-16:30)</b>		
	司会 五十嵐俊二 (エーザイ)	68
まとめ	柳田 知司 (前臨床医学研)	

## はじめに

サテライト企画委員長 五十嵐俊二（エーザイ）

「優れた医薬品をより早く世界の患者に！」という理念に基づき推進してきた、ICH（日・米・EU三極医薬品承認審査ハーモナイゼーション国際会議）の根幹をなす目的の一つは、国によるガイドラインの乖離のために、科学的に余り意味のない試験の重複実施による資源と時間の無駄を省くことにあったが、ヒトにおける医薬品の安全性の為の毒性試験が如何にあるべきかを追求し、従来の毒性試験法を今日の科学水準で見直し、その質的向上を目指す絶好の機会となった。その過程で厳然として存在する国による差が何に由来するかを知り、相互理解が深まり、問題を話し合い、解決を探る場ができたことは大変有意義であった。日米欧の行政側代表によって調印され、既に実施の段階にあるICHガイドラインは以下の通りである：

- 1) 単回・反復投与毒性試験：無毒性用量の定義、長期毒性試験の投薬期間など、
- 2) 生殖発生毒性、
- 3) がん原性試験：用量設定指標、
- 4) トキシコキネティクス、
- 5) 反復投与臓器分布試験の必要な条件。

我々が、今、直面する最大の課題は、“ICHガイドラインを如何に実践し、より有効に、運用するか”にある。即ち、国際調和を目指して作成されたICHガイドラインに対する認識が国によって異なり、違った運用がなされるならば、目指す国際調和から早々に脱線するであろうと案ぜられる。懸念される阻害因子の一つはガイドラインに対するチェックリスト的な認識であり、画一的な取り組みであろう。“試験実施の必要性（科学的根拠）は殆ど無いが、万一（ペンディング）に備えてやっておこう”と言う企業側の事勿れ主義（厚め厚めの手当）のもとらす悪影響も充分配慮されねばならない。如何に試験を効率的に進めるかは、それぞれの状況に応じ、試験実施者の科学的な自由裁量に委ねられている。

本サテライトシンポジウムでは、ICHガイドラインの本質の理解を深め、より有効に運用するための課題を討議したい。具体的には、1) 各試験の進め方、ケースバイケースの対応など、ICHガイドラインの実践におけるポイントを、事例紹介を含め、討議し、2) 毒性試験を企画・実施する者、試験データを評価・審査する者、それらの研究者を教育・育成する者、それぞれの立場から、今後の課題を検討する。この目的のため、昨年12月に、単回・反復毒性試験生殖発生毒性試験、遺伝毒性試験、がん原性試験、トキシコキネティクス、反復投与組織分布試験、バイオ医薬品の安全性試験の7つの議題について、産官学の各々の分野から専門の先生方に参画を願い、ワーキンググループを編成した。以来、事例研究を含め、それぞれの試験種における問題点の抽出と対応を検討してきた。本日の各セッションの発表は各ワーキンググループにおける討議内容を数名の代表者によって紹介しようとするものである。これらの討議が本日のシンポジウムのみならず、皆さんの研究所、職場で更に展開され、ICHガイドラインが‘より科学的に、より効率的に、より主体的に’に実践されることを期待する。

キーワード： ‘ガイドラインの解釈の国際的調和’  
‘脱チェックリスト感覚’  
‘より科学的に、より効率的に、より主体的に！’

## セッション1 単回・反復毒性試験

司会： 小野 宏 (食品薬品安全センター)  
松沢 利明 (山之内製薬)

### 単回・反復毒性試験検討班

リーダー	黒川 雄二 松沢 利明	国立衛生試験所安全性生物試験研究センター 山之内製薬 創薬安全性研究所
委員	遠藤 仁 小野 宏 門田 利人 橋本 正晴 長谷川隆一 苗代 一郎 三森 国敏	杏林大学 医学部 食品薬品安全センター 秦野研究所 フリストル・マイヤース・スクイブ 神奈川研究所 藤沢薬品 安全性研究所 国立衛生試験所 毒性部 武田薬品工業 薬剤安全性研究所 国立衛生試験所 病理部



## 単回投与毒性試験の問題点

橋本 正晴 藤沢薬品工業安全性研究所

医薬品開発における単回投与毒性試験の意義は以下の様に位置づけられる。

- 1) 大量単回投与により発現する種々の変化と用量との関係を把握し、ヒトに初めて投与される際、あるいは誤って過量投与された場合に発現する臨床副作用を見極めること。
- 2) 開発の初期段階での実施により、反復投与試験の用量設定のための情報を提供すること。

この点を踏まえ、ICH-1(1991、プラザセル)の合意を受けて、1993年8月にわが国のガイドラインが改訂された。改訂されたポイントは、毒性徴候と概略の致死量を求める(多数の動物を用いたLD<sub>50</sub>の算出の必要はない)こと、increasing dose tolerance studyの成績も受理されること、臨床投与経路のみでよいこと、動物数は規定しないことなど、個々の研究者の裁量にゆだねられている部分が増えており、より科学的な評価を行うことが期待されている。この観点から試験を実施していく中で、開発初期に実施するために生じるGLP上の問題、試験計画を立案する際に起こる問題、科学的な観点から意義に乏しいと考えられる問題がみられるのも現実である。今回、以下の点について討議を深めたい。

### 1) 単回投与試験に用いる動物種の選択は？

動物種を選択するにあたっては、薬効評価に使用している動物、あるいは代謝パターンがヒトに類似している動物が最適である。しかし、これらをすべて満足することは難しく、入手しやすく、質的にも均一で背景データも豊富な動物、さらに反復投与毒性試験で汎用されている動物として、ラット、イヌが用いられている。但し、イヌについては症状観察、検査等実験手技的に扱い易い反面、動物愛護の点から問題視されており、increasing dose tolerance studyの成績を活用されることが有用とされている。

### 2) 絶食の必要性？

薬物の経口吸収性は、一般的に絶食時の方が摂食時に比べ良いとされている。しかし、薬物によっては摂食時の方が明らかに良いケースもあり(表1参照)、試験結果に大きな食い違いがみられる場合がある。ガイドラインでは絶食を推薦しているが、薬物によりPK・TKデータを基にケース・バイ・ケースの対応が必要である。

表1： 薬剤BのPKデータ

	投薬量(mg/kg)	AUC ( $\mu\text{g hr/ml}$ )	Cmax ( $\mu\text{g/ml}$ )	Tmax (hr)	t <sub>1/2</sub> (hr)
絶食時	80	17.7	0.9	1.7	13.9
非絶食時	80	313.6	45.9	6.3	11.0

### 3) 2週間の観察期間が必要か？

単回投与後の急性症状を観察することが主目的であり、それが継続しないかぎり、2週間は必要ないのではないかと。これとは反対に抗癌剤、ステロイド剤、消炎剤などの遅発毒性の窺われる薬剤は、更に長い期間の観察を行うことが望ましい。急性症状がみられる時期に各種検査（臨床病理、機能検査）を行い、より多くの情報を得ることが必要である。

なお、FDAは最近（本年3月）、ヒトの単回投与の実施条件として、従来の2週間反復投与毒性試験に替えて、単回投与毒性試験のデータでもよいとする見解<sup>(1,2)</sup>を出しており、同時に、急性毒性試験のあり方を見直し、より科学的で具体的な試験の内容を提案している（表2参照）。詳細を検討し、積極的にコメントを提示し、我々の見解も反映させたい。

表2 FDAの単回投与毒性試験ガイドライン案の要点

動物種：	げっ歯類1種、非齧歯類1種
投薬経路：	臨床適用経路と静脈内投与
投与量：	致死量を含む多段階用量、用量－反応の解明
観察期間：	14日
観察項目：	毒性症状の発現消失の時間経過、臨床検査、 主要臓器について病理組織学的検査；可逆性も検討すること
その他：	トキシコキネティクスの実施

#### 参考資料

- (1) A.Monro, D.Mehta: Are single-dose toxicology studies in animals adequate to support single doses of a new drug in humans? *Clinical Pharmacology & Therapeutics*,59,3,258-264,(1996)
- (2) J.Choudary, J.F.Contrera, A.DeFelice, J.J.DeGeorge, J.G.Farrelly, G.Fitzgerald, M.A.Goheer, A.Jacobs, A.Jordan, L.Meyers, R.Osterberg, C.Resnick, C.J.Sun,R.J. Temple: Response to Monro and Mehta proposal for use of single-dose toxicology studies to support single-dose studies of new drugs in humans. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*,59,3,265-267,(1996)

## イヌ長期反復投与毒性試験の期間は6、12それとも9カ月？

門田 利人 プリストル・マイヤース・スクイブ 神奈川研究所

長期反復投与毒性試験の投与期間に関して、1991年 Brussels での ICH1 でげっ歯類については6カ月間でハーモナイズされたが、非げっ歯類については3極での合意はできず、以後、以下の経緯をたどってきた。

- 1) 1991年11月 ICH1 Brussels  
日欧は6カ月で合意、FDAは12カ月の検討の必要性を付帯。
- 2) 1992年7月 ICH-EWG London 会議  
JPMA、CMR (Centre for Medicines Research)、FDA の Database の紹介。  
調査結果を受け、日欧は6カ月を再主張、一方、FDAは6カ月は時期尚早と主張。
- 3) 1993年3月 ICH-EWG Brussels 会議  
FDAは"prospective な調査"を提案。
- 4) 1993年6月 ICH-EWG Washington 会議  
日欧は"prospective な調査"を拒否。
- 5) 1995年11月 ICH3 横浜会議  
FDAはJPMA、CMR、FDA の Database の18薬剤について再分析して、9カ月投与試験を提案。

JPMA と CMR は retrospective な調査を行い、「ほとんどの薬剤では6カ月以内で毒性学的に意義のある所見は観察可能である」と結論し、結果を1992年7月 ICH-EWG London 会議で発表すると共に、Adverse Drug Reactions and Toxicological Review, Vol 12 (1993) に公表した。また、両団体は過去に毒性研究者に対するアンケートを実施し、同様な結論を得ている。これらの結果を受け、日本では、前ガイドライン(1989年通知)では12カ月であった投与期間が、現行ガイドライン(1993年通知)では最長6カ月に変更された。ただし、12カ月投与も薬剤によっては必要とされ、また、その解説書には ICH の成果によっては投与期間の見直しもあり得るとの記載もある。

一方、FDAは1992年の London 会議で発表された JPMA、CMR、FDA の Database を再分析して、1995年に9カ月投与試験を提案した。再評価した18薬剤の内訳は CMR の Database からの3剤、JPMAからの5剤、Bayer 社からの2剤、ゼネカ社からの1剤、FDAからの7剤である。本年5月の Washington での ICH-EWG 会議では、CMR が世界の主要な製薬会社へ実施した「9カ月試験アンケート」の中間結果が示された。また、JPMA がイヌ3/12カ月投与試験を追加調査(22薬剤)し、6カ月以降で毒性学的に意義ある新たな所見が現れた事例はなかったことの結果も発表された。会議では主に厚生省、FDA、EUの官側の対応が協され、9カ月試験提案の根拠となった18薬剤について、詳細なデータの収集及び官側による評価の実施が当面の方針となった。9カ月投与については、その提案が必ずしも科学的判断から導き出されたとは言い難く、背景データがないことから、実施への不安も少なくない。9カ月試験が採用された場合、何カ月の短期試験と組み合わせる実施するかの問題もあり、また、12カ月投与と

比較して、9カ月投与のメリットも明確でない。更に、9カ月試験を提案しているFDA内部で必ずしも意見は一致しておらず、「ICHの非臨床試験の実施タイミング（M3）」検討グループのFDA専門官は最長12カ月投与試験を要求している。

9カ月試験の採択については、今後も紆余曲折が予想されるが、官側による18薬剤の再評価がどのようになされ、活かされるか注目したい。

## 無毒性及び毒性用量に関する事例研究

苗代 一郎 武田薬品工業・薬剤安全性研究所

反復投与毒性試験の目的は被験物質を繰り返し投与したときの毒性プロファイルを明らかにする共に、毒性変化の現れない量（無毒性量）を求めることである。旧ガイドラインでは「無影響量」が「毒性変化が認められない用量」と定義されていたが、無作用量と解釈されたこともあった。国際調和が進展するなかで、この無影響量の考え方の違いが問題となり、1991年のICH-1の合意に基づき、毒性変化を示さないことを明確にするために「無影響量」は「無毒性量」に改められた(1993年)。更に、1993年の日本毒科学会では「無毒性量の考え方」について討議され、無毒性量を求めるためのアルゴリズムが提案された。

無毒性量あるいは毒性量を求める意義は、a) ヒトにおける耐量 (tolerance dose) の予測、b) 安全性の指標として、薬効量との比較、c) 類薬との毒性比較、d) 外来異物としての毒性の一指標と考えられており、反復投与毒性試験を計画する場合、無毒性量を求めるために投与量設定には細心の注意が払われる。また、毒性評価に際して無毒性量を決めるということは、発現した所見についてどれが毒性変化であり、その変化がどの用量から発現しているかを判断することである。そこで、無毒性量に関する問題点について、降圧薬を例に話題を提供したい。

アンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害薬やアンジオテンシン II 受容体拮抗薬の場合は、レニン-アンジオテンシン系の作用を抑制することにより血圧を下げ、体重増加抑制、血漿中尿素窒素 (UN) の上昇、心重量の減少、腎臓の旁糸球体 (JG) 細胞の肥大、副腎球状帯の萎縮、貧血などの所見が観察される (表1)。一方、カルシウム拮抗薬やカリウムチャンネル開口薬の場合は、末梢血管を拡張させることによって降圧作用を発現し、眼結膜の充血、反射性瀕脈、心重量の増加、心臓の乳頭筋の壊死、歯肉の肥厚、副腎束状帯の肥厚などの変化がみられる (表2)。これらの変化はそれぞれの薬物の薬理作用あるいはその二次的変化に起因したものであると考えられており、毒性変化と薬効薬理作用に基づく徴候とに区別することは困難である。例えば、ACE 阻害薬における UN の変化は比較的低用量から用量依存的に上昇し、心重量の減少は器質的变化を伴わない、また、JG 細胞の肥大はレニン合成の亢進を示し、期待する薬理作用の二次的変化である。このように、薬物による所見を画一的な方法で毒性変化と薬効による変化とに区別し、無毒性量の数値を求めることは容易でない。

医薬品開発における前臨床試験はヒトへの安全性あるいは危険性の予測が目的である。したがって、医薬品の毒性評価では毒性のプロファイルとその発現メカニズムを明らかにすることがより重要である。その結果として、無毒性量を求めることが可能となる。

表1 ACE阻害薬及びアンジオテンシンII拮抗薬の毒性試験所見とその発現機作

所見	発現機作
体重増加抑制	電解質バランスの変化 ?
摂餌の抑制	電解質バランスの変化 ?
尿量の増加	アルドステロンの分泌抑制
飲水量の増加	尿量増加に対する代償性変化
貧血	エリスロポエチンの産生抑制
血漿中尿素窒素の増加	糸球体濾過量の減少
心重量の減少	後負荷軽減、交感神経抑制、 心筋蛋白合成の抑制
副腎球状帯の萎縮	アルドステロンの産生抑制
腎臓JG細胞の肥大	レニン産生の増加
腎臓小葉間動脈の内膜増殖	腎血行動態の変化
腎臓の好塩基性細管	腎血行動態の変化 ?
胃粘膜の潰瘍、びらん	?

表2 ジヒドロピリジン系Ca拮抗薬の毒性試験所見とその発現機作

所見	発現機作
体重増加の抑制	摂餌の抑制
摂餌の抑制	消化管機能の抑制
口腔、結膜、耳介の発赤、充血	末梢血管の拡張
心拍数の増加	反射性の交感神経の緊張亢進
心重量の増加	反射性の交感神経緊張亢進、 前負荷の増加
	レニン・アンジオテンシン系の亢進
心臓の乳頭筋の壊死、繊維化	心仕事量の増加
副腎球状帯の肥大	反射性のレニン・アンジオテンシン系 の亢進、アルドステロンの分泌亢進?
歯肉の肥大、過形成	末梢血管の拡張

## セッション2 生殖発生毒性試験

司会： 川島 邦夫（国立衛試）  
高山 敏（埼玉第一製薬）

### 生殖発生毒性試験検討班

リーダー	田中 悟 高山 敏	国立衛生試験所 毒性部 埼玉第一製薬 研究部
委員	赤池 雅司 岩瀬 隆之 川島 邦夫 佐々木真敬 成田 裕保 西村美智子 中塚 敏夫 堀本 政夫	ヘキスト マリオン ルセル開発研究所 三菱化学 安全性研究所 国立衛生試験所 毒性部 旭化成 安全性研究所 スミスクライン・ビーチャム前臨床開発部 ベーリンガーインゲルハイム実験病理学部 萬有製薬 安全性研究部 ファイザー 中央研究所

## ICHガイドラインの実践とその所感

赤池 雅司	ヘキスト マリオン ルセル 開発研究所
岩瀬 隆之	三菱化学 横浜総合研究所
成田 裕保	スミスクライン・ビーチャム 前臨床開発部
佐々木真敬	旭化成工業 ライフサイエンス総合研究所

生殖発生毒性試験のICH(International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) ガイドラインが3極で合意されたのは1993年である。また、日本の厚生省がICHガイドラインに基づいて実施したデータを受入れることを通知したのはそれから1年後の1994年である。雄の交配前投与期間及び検査項目について厚生省および日本の製薬企業16社の共同研究がなされ、その結果を基にした一部改訂案が今年のICH3で承認された。ICHでは生殖発生毒性試験以外にもガイドラインが検討されているが、スムーズに合意されたのはこのガイドラインが最初であった。こうした背景を基に日本製薬工業協会基礎研究部会第3分科会は同協会加盟各社のICHガイドラインの取り組みと考え方についてアンケート調査を行った。

### 1. ICHガイドラインの使用状況

ICHガイドラインの使用状況は以下の如く、Study A(Seg.I) 及びStudy C(Seg.II) の実施企業が多く、試験の優先順序及び開発における重要性をうかがわせるものであった。

ICHガイドライン準拠で実施 試験数		47/62 (75.8%)
Study A (Seg. I)	39	(62.9%)
Study B (Seg.III)	21	(33.9%)
Study C (Seg. II)	37	(59.7%)

### 2. 試験の組合わせ

ICHガイドラインと従来のガイドラインの組合わせ実施は、31社(65%)であった。Study Aは、反復投与試験で精巣毒性がみられない場合に組合わせ実施をしており、Study B(Seg.III)はSeg.IあるいはSeg.IIが実施済で既存データでは生殖発生毒性評価が可能と判断した場合であった。反対に、組合わせ実施をしない理由は従来のガイドラインを一貫する、あるいはSeg.I & IIを実施済の場合、敢えて投与期間が重複するStudy Bでは何等かの影響が検出された場合に、解析が困難であると判断していることによるものであった。従来の試験は投与期間の重複はなく、投与時期との関係が明確であった。ICHガイドラインではStudy CとStudy Bの投与時期は重複しているものの目的は、主として前者が催奇形性の有無であり、後者が分娩及び出生児への影響について目的を絞ったものである。各社充分試験目的を考慮した組合わせを行っていることを反映している結果と思われる。

### 3. Most probable option以外の試験

ICHガイドラインではStudy A,B,C (Most probable option) 以外にいくつかの組合わせ試験が可能であるが、実施企業数は8社(13%)のみであった。さらに実施理由はいづれも低毒性、他の試験で生殖器官に毒性変化が認められないあるいは主要パラメーターに変化がない場合に選択したものであった。実施しない



理由は、Study A,B,C以外不要、理由付けが困難、再試験の可能性をあることを上げている。これは、開発効率を充分考え、毒性が検出された場合はよりのを絞った追加試験を組むことを事前に考慮しているためであろう。

#### 4. 精子検査

従来の試験と大きく異なる点は雄性生殖能の検査に精子検査が入っていることである。既に精子検査を実施しているのは37社(80.4%)であったが、多くは用手法25社(67.6%)であった。精子数を検査項目としているのは36社(78.2%)であり、精子数と活力を指標としているのは26社(56.5%)であった。次に形態、生存率であった。自動分析装置を使用している場合数々の精子パラメーターの測定が可能である。しかしながら、パラメーターの毒性学的意義が明らかでないため、あるいは測定項目のバリデーションが不十分であるとの理由から前述の2項目を選択している。新しい検査方法と用いられる項目については十分な毒性学的意義が必要と考えている結果であろう。機器を使用する場合数値化され、その数値は統計学的処理結果で判断される。最終的な毒性学的評価には他のパラメーターの組み合わせが必要なのではないだろうか。一方、精子以外の雄性生殖能評価項目としては従来の交尾率(46社、75.4%)、受精(42社、68.9%)を採用していた。

#### 5. 交配前の投与期間

具体的な投与期間では、雄の場合、4週間を基本に実施しているのは51社(91%)でICHガイドラインあるいは反復投与試験結果から判断している(46社、79.3%)。剖検時期は雌の受胎確認後36社(65.5%)、交尾成立/交配期間終了後15社(27.3%)であった。雌に関しては、ICHガイドラインあるいは再交配等を考慮し、50社(93%)が交配前2週から妊娠7日までとし、ICHガイドラインあるいは試験の目的、即ち着床胚の生死を確認すれば良いという考えから妊娠中期の剖検を実施している(44社、72.1%)。

#### 6. バイオ医薬品

現在のICHガイドラインは化学物質についてのものである。バイオ医薬品については別ガイドラインが検討されている。既存のガイドラインは化学物質のガイドラインに準じる内容である。各社の抱える問題点は、実験動物にとっては異種蛋白であり抗体が産生されるため試験の意義が不明確10社(62.5%)であった。バイオ医薬品は基本的にヒトの生体成分であることから実験動物での試験の意義について更に検討が必要と思われる。

#### 7. 相違点

これまでICHガイドラインの取り組みと考え方についての調査結果について述べてきた。最後に他社あるいは外国と相違点を感じているか否かについては試験の実施方法あるいは評価方法についてそれぞれ36社(59.0%)、34社(55.7%)が相違はないと回答している。しかしながら、相違点として異常、変異の分類が異なることや毒性評価そのものが異なるとの回答があり根本的な相違も指摘されている。

#### 8. 長所、短所

ICHガイドラインの長所として試験期間の短縮が最も多く、次いで生後観察がStudy Bのみになったこと、試験デザインの柔軟性が上げられている。逆にウサギの動物数の増加、試験デザインの選択の余地がなくなったこと、より高い科学水準が要求されることが短所として上げられている。しかしながら、ICHガイドラインでは、注1. 科学的柔軟性、に記述されている様に”ガイドラインは

試験の方策に工夫を加える基本的なよりどころ”である。従って、ガイドラインの主旨が十分に理解されていないとも推測される。

#### 9. タイミング

さて、前臨床試験結果を基に臨床試験（第1相試験）に移行して行くが、通常男性健常者で実施される。実際に開始前に実施している生殖発生毒性試験はStudy A 48社(91%)、Study A及びCの両方を実施しているのは14社（30%）であった。実施理由として男性生殖能への影響およびヒトへの外挿32社(51.6%)、社会倫理/臨床医からの要求/会社の方針12社(19.4%)であった。また、女性での臨床試験についてはStudy AのみあるいはStudy Aを含む複数試験を実施してであった。生殖能及び次世代児への影響を把握し、ヒトに外挿する(23社、51.1%)、社会倫理/臨床医からの要求/会社の方針7社(15.6%)であった。

#### 10.所感

アンケートを集計した感想として以下の点が上げられる。

- 1) ICHガイドラインを積極的に取入れて実施している。
- 2) 従来のガイドラインとの組み合わせについては試験目的を考慮した組合わせを行っている。
- 3) ガイドラインの主旨を理解し、ガイドラインにとらわれない毒性学的な総合判断の基に試験に取り組むことが重要と思われた。

## 事例：生殖発生毒性試験の Standard protocols

堀本 政夫 ファイザー製薬株式会社 中央研究所

ファイザー社はworldwideな研究開発を目指して13ヵ国34の研究所を有し、その中で米国（グロトン）、フランス（アンボワーズ）、日本（武豊）における中央研究所では新薬の安全性評価のための前臨床試験を行っている。従来、各研究所で実施してきた試験方法はガイドラインに由来する試験デザインの違いだけでなく、1群の動物数、投与期間、胎児および出生児の検査方法などにも多くの相違点がみられた。しかし、1993年6月に日・米・EU三極医薬品規制ハーモナイゼーション国際会議（ICH）運営委員会において、ICH Harmonized Tripartite Guideline "DETECTION OF TOXICITY TO REPRODUCTION FOR MEDICINAL PRODUCTS"（以下「ICHガイドライン」という）が承認されたのを契機に、ファイザー社では本格的に生殖・発生毒性試験のハーモナイゼーションを開始した。このハーモナイゼーションが進めば、日・米・仏のいずれかの研究所で実施した試験のデータが何処の承認申請にも使えるようになり、新薬に対する生殖・発生毒性の評価を効率良く進められるばかりでなく、医薬品開発の促進や患者への迅速な提供につながる大きな成果が期待される。そこで、われわれは開発スケジュールに合わせて効率良く試験が遂行でき、ICHガイドラインで"The most probable option"として挙げられている3試験計画法を基に各研究所共通のReproductive Standard Protocolsを作成した。

本シンポジウムでは、ファイザー社で作成したFertility and Early Embryonic Development Study (Study I), Pre and Postnatal Development Study (Study II), Teratology Study (Study III)の他に、Maternal Range Finding StudyとToxicokinetics Studyを加えた5種のStandard Protocolsについて、その概略、特徴、課題などを紹介する。各試験のポイントは以下の通りである。また、試験の概略をTable 1およびFigure 1に示した。

### - Maternal Range Finding Study

- ・妊娠動物を用いた予備試験であり、GLP適用下で実施している。
- ・試験デザインはTeratology試験と同じである。

### - Toxicokinetics Study

- ・妊娠母体および胎児への薬物の曝露を明らかにすることを主目的として Maternal Range Finding Studyの中でサテライト群を設けて実施している。
- ・GLP適用下で母体血中および胎児内薬物濃度を測定する。

### - Teratology Study

- ・ラット、ウサギとも胎児の骨格標本の作製には軟骨部の異常や化骨遅延との鑑別に有用な骨・軟骨二重染色法を採用している。
- ・ウサギ胎児は新鮮標本による内臓観察とする。

### - Fertility and Early Embryonic Development Study

- ・雄の投与期間は通常、交配前4週間とするが、精子形成サイクルを考慮して、その後も投与を継続し通算60日以上とする。
- ・雌は交配前14日から妊娠7日までとし、胚吸収部位の識別に有用な妊娠14日に屠殺する。

### - Pre and Postnatal Development Study

- ・試験期間はF1世代へのhormonal functionへの影響を考慮して、F1児は交配、分娩させ、F2児が離乳するまで観察する。

- ・ 出生児の検査項目はICHガイドラインに推奨されている項目に加えて、機能（行動）試験として自発運動量測定、水迷路試験、受動的回避能試験を実施する。

一方、我々はStandard Protocolsの作成だけでなく、検査技術、評価方法に対するハーモナイゼーションも重要であると考えており、各研究所の試験担当者による技術研修会を開催している。これまでに「ウサギ胎児の新鮮標本による内臓観察法」「ラット出生児の行動試験法」「CASA装置を用いたラット精子検査法」をテーマとして技術研修会を開催した。

このようにファイザー社のハーモナイゼーションは、ICHガイドラインと同様、その第1歩を踏み出したばかりであり、異常の基準、骨格検査項目、統計方法、報告書作成システムなどハーモナイズしなければならない課題は数多く残されている。しかし、三極間の緊密なコミュニケーションにより、さらにハーモナイゼーションを推進させるとともに最新の技術水準に基づいた試験デザインの検討も続けていく必要があると考える。

Figure 1 HARMONIZED REPRODUCTIVE STUDY DESIGNS

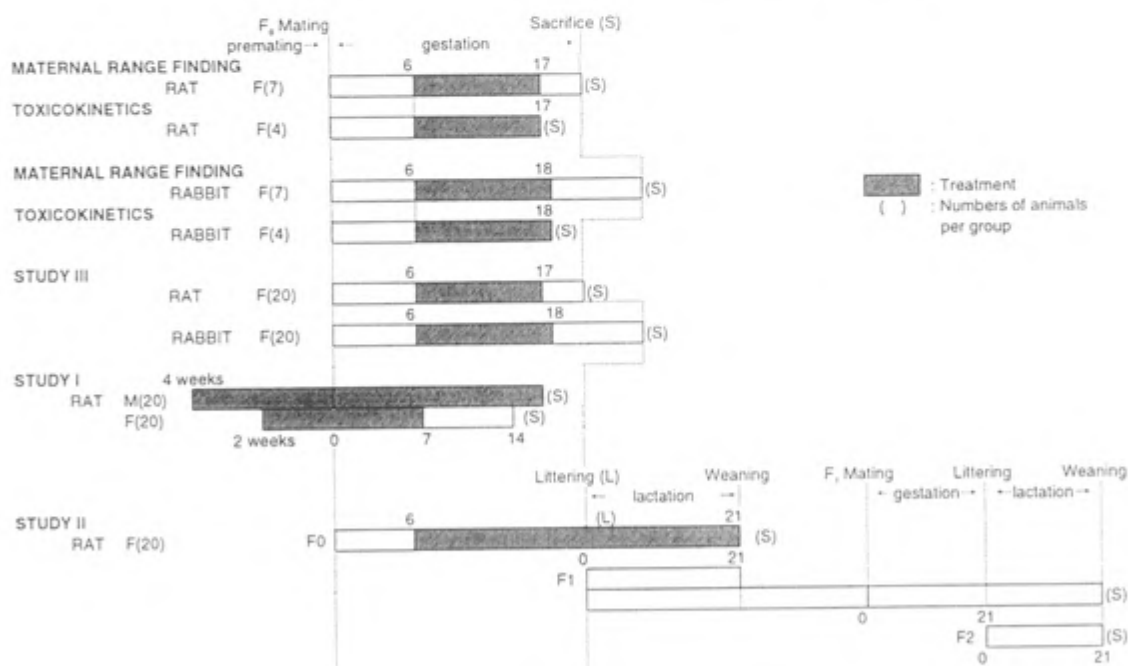


Table 1 : OUTLINE OF REPRODUCTIVE STANDARD PROTOCOLS

MATERNAL RANGE FINDING STUDY IN RATS AND RABBITS

Conduct in compliance with GLP

Animals: 7 copulated rats/dose group, 7 inseminated rabbits/ dose group

Treatment: 3 doses plus a vehicle control

Gest. Days 6 - 17 for rats, Gest. Days 6 - 18 for rabbits

Endpoints: Cesarean section at term

Fetal examination, counts, body weights, sex, external examination

TOXICOKINETICS STUDY IN RATS AND RABBITS

Run in parallel with Maternal range finding study

Animals: 4 copulated rats/dose group, 4 inseminated rabbits/ dose group

Treatment: 3 doses plus a vehicle control

Gest. Days 6 - 17 for rats, Gest. Days 6 - 18 for rabbits

Endpoints: Maternal blood samples collected on last day of dosing

Cesarean section after last blood sample

Maternal plasma (serum), fetal tissue analyzed for presence of compound.

REPRODUCTIVE STUDY III: TERATOLOGY STUDY IN RATS AND RABBITS

Animals: 20 copulated rats/dose group, 20 inseminated rabbits/ dose group

Treatment: 3 doses plus a vehicle control

Gest. Days 6 - 17 for rats, Gest. Days 6 - 18 for rabbits

Endpoints: Cesarean section at term

Fetal examination,

Visceral examination for rats : fixed specimens

for rabbits : fresh

Skeletal examination: double staining

REPRODUCTIVE STUDY I: FERTILITY AND EARLY EMBRYONIC DEVELOPMENT STUDY

Animals: 20/sex/dose group

Treatment: 3 doses plus a vehicle control

Males treated for 4 weeks prior to and through mating until sacrifice (>60 days)

Females treated for 2 weeks prior to mating through implantation, Gest. Day 7

Endpoints: Mating period - 2 weeks, 1:1

Estrous cycle evaluation by vaginal smear

Cesarean section, all females, Gest. Day 14

Retention of reproductive organs

Histopathology of testis

Sperm count and sperm motility

REPRODUCTIVE STUDY II: PRE AND POSTNATAL DEVELOPMENT STUDY

Animals: 20 pregnant rats/dose group

Treatment: 3 doses plus a vehicle control

Gest. Day 6 through Postnatal Day 21

Endpoints: All females are allowed to litter

Postnatal developmental assessments

Behavioral tests to measure sensory function, motor activity, learning

and memory 1/sex/litter selected and mated for F2 generation through

Postnatal Day 21.

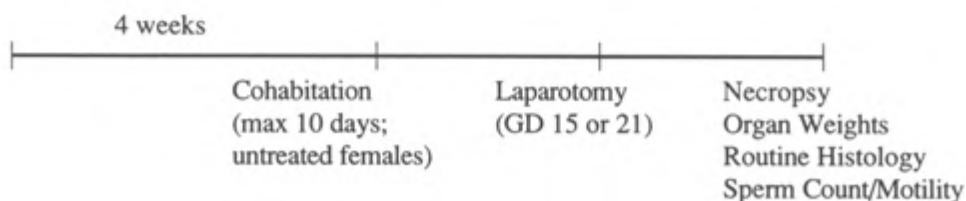
# Assessment of Male Reproductive Toxicity in Rats Under ICH Guidelines

Mark A. Cukierski, Ph.D.  
Department of Safety Assessment, Merck Research Laboratories,  
West Point, Pennsylvania USA

A major goal of the tripartite international conference on harmonization (ICH) guidelines for detection of reproductive toxicity was to maintain flexibility of study designs and to avoid strict adherence to rigid, and often unscientific, rules. The general guiding principles inherent in the design of the guidelines were that 1) they should describe screening studies to identify agents that specifically disrupt reproduction, 2) screening studies should not be designed to identify the critical stage, mechanism of action or full expression of the effect, and 3) results of screening studies should be used to determine if further investigation is warranted. It is implicit in the guidelines that interpretation of reproductive effects would be made in context with general systemic toxicity studies at similar doses when possible. As was stated in the guidelines, an area where more basic research would be useful in optimization of study designs was in male fertility assessment, especially the optimal treatment period for males prior to mating. Recent revision in the guidelines agreed on at the ICH meeting in Yokohama in 1995 have further justified the use of a 4 week pretreatment period of males prior to cohabitation. This was based on data from a variety of test agents in a prospective collaborative study in Japan (Takayama et. al.) and a retrospective literature analysis (Ulbrich and Palmer). One specific issue which has not been adequately addressed in the guidelines is the utility of quantitative staging of spermatogenesis, which was implied but not specifically stated as a required endpoint. At this time, sufficient data does not exist for a consensus. Staging has been employed in our laboratory to clarify findings in specific cases, but we do not feel that this technique is warranted or useful as a general screen. There is also insufficient information to put findings from staging analysis into perspective for human risk assessment.

It has been evident for some time that mating trials of males, even after prolonged exposure to test compounds, is an insensitive indicator of male fertility. The focus of male reproductive assessment has now shifted to include study designs with several overlapping endpoints, as well as reliance on previous subchronic toxicity studies which include organ weights and histopathology of the reproductive tract. The current design for male fertility studies in our laboratory is diagrammed below, assuming no significant effects have been observed in the reproductive organs in subchronic studies, usually 5 to 14 week duration.

## Fertility Study in Male Rats n = 25/group



The major study endpoints are:

- Function (mating behavior/pregnancies produced)
- Sperm count/ - epididymis
- Sperm /motility - vas deferens
- Organ weights
- Histology

This design, in conjunction with results of the routine subchronic toxicity studies, is adequate to detect possible effects on male reproduction and provide preliminary data for more detailed studies should positive findings occur.

In the past several years, we have examined a number of compounds that have shown effects on male reproduction. In several cases we have had to use lengthy exposures and/or unusual study designs to demonstrate effects on male fertility. In one case, it was found that the age of the male at the start of treatment had significant effects. Younger males (6-week old) required 12 weeks of treatment to show a moderate decrease in fertility whereas 15-week old males required 24 weeks to show similar effects (Wise et. al.). In examining the mechanism of these effects observed matings, intrauterine sperm counts and artificial insemination were utilized to resolve the mechanism of decreased fertility (Cukierski et.al.). In another case, treatment required 11 to 15 weeks to show significant effects on fertility parameters. However, in all cases we have experienced in our laboratory the above findings would not have been missed by use of the routine study design; as changes observed in organ weight or histopathology of the reproductive tract were evident within two days to two weeks even though it required up to six months to see effects on fertility. Data from these studies will be presented to illustrate the need for adequate toxicity data prior to initiation of male fertility studies and the need for flexibility in design and selection of endpoints.

#### References

- Takayama, S., Akaike, M., Kawashima, K., Takahashi, M., and Kurokawa, Y. 1995. A collaborative study in Japan on optimal treatment period and parameters for detection of male fertility disorders induced by drugs in rats. *Journal of the American College of Toxicology*. 14(4): 266-292.
- Ulbrich, B. and Palmer, A.K. 1995. Detection of effects on male reproduction - a literature survey. *Journal of the American College of Toxicology* 14(4): 293-327.
- Wise, L.D., Minsker, D.H., Cukierski, M.A., Clark, R.L., Prahalada, S., Antonello, J.M., MacDonald, J.S., and Robertson, R.T. 1991. Reversible decreases of fertility in male sprague-dawley rats treated orally with finasteride, a 5 $\alpha$ -reductase inhibitor. *Reproductive Toxicology*, Vol. 5, pp. 337-346.
- Cukierski, M.A., Sina, J.L., Prahalada, S., Wise, L.D., Antonello, J.M., MacDonald, J.S., and Robertson, R.T. 1991. Decreased fertility in male rats administered the 5 $\alpha$ -reductase inhibitor, finasteride, is due to deficits in copulatory plug formation. *Reproductive Toxicology*, Vol. 5, pp. 353-362.

## セッション3 遺伝毒性試験

司会： 祖父尼俊雄（国立衛試）、島田 弘康（第一製薬）

### 遺伝毒性試験検討班

リーダー	祖父尼俊雄	国立衛生試験所 変異遺伝部
	島田 弘康	第一製薬 安全性研究所
委員	太田 敏博	東京薬科大学
	菊池 康基	ラビトン大阪医薬品開発研究所
	田中 憲穂	食品薬品安全センター
	能美 健彦	国立衛生試験所 変異遺伝部
	林 真	国立衛生試験所 変異遺伝部
	降旗 千恵	東京大学 医科学研究所
	三宅 幸雄	塩野義製薬 新薬研究所
	森田 健	日本グラクソ 筑波研究所
	若田 明裕	山之内製薬 創薬安全性研究所



## ICHによって遺伝毒性試験ガイドラインはどう変わるか？

祖父尼 俊雄 国立衛生試験所 変異遺伝部

遺伝毒性試験については、ガイドラインを網羅的に検討するのではなく、調和に必要な重要課題を取り上げ、それらを優先的に検討することとし、次のような問題点を取り上げた：

- 1) 細菌を用いた復帰突然変異試験における大腸菌株の必要性,
- 2) In vitro 試験における最高用量の定義,
- 3) In vitro 試験での析出濃度での試験の実施,
- 4) In vitro 試験における確認試験の必要性,
- 5) In vitro 試験で陽性結果が得られた場合に必要試験,
- 6) 骨髄を用いた染色体異常試験と小核試験の同等性,
- 7) 小核試験における雌雄動物の必要性,
- 8) In vivo 試験の陰性結果に対する標的臓器における暴露量評価の必要性,
- 9) 標準的な試験の組み合わせにおける培養細胞を用いる遺伝子突然変異試験の必要性,
- 10) 標準的な試験の組み合わせの定義,
- 11) Phase I に関連した遺伝毒性試験の実施のタイミング。

これらのうち、最後のタイミングの問題は他の毒性試験と共に論議する必要があることから、現在このためのEWGが設けられ、論議が行われている。9)の問題は10)と密接に関連しているので、まとめて論議が進められているが、なかなか合意点が見いだせず、最近ようやくStep-2に近づきつつある。その現状は別途報告がある。4)のin vitro 試験における確認試験も合意が遅れたため、標準的な試験の組み合わせの問題と共に取り扱われているが、その内容をここで紹介する。残りの7つの課題については合意が得られ、すでにStep-4のサインが行われている。上記の2)と3)も内容が関連しているので、同じ項目に入れて記述してある。Step-4の記載項目は上記のものとは若干異なっているが、以下のようになっている。

1. In vitro 試験の特定項目に関するガイダンス
  - a) 細菌による突然変異試験に用いる菌株の基本セット
  - b) In vitro 試験における最高用量の定義
2. In vivo 試験の特定項目に関するガイダンス
  - a) In vivo で染色体異常を検出するために受け入れられる骨髄を用いる試験系
  - b) 骨髄小核試験における雌雄げっ歯類の使用
3. 試験結果の評価のためのガイダンス
  - a) In vitro 試験結果の評価のためのガイダンス
  - b) In vivo 試験結果の評価のためのガイダンス

これらの項目の内容を紹介すると共に、それによって本邦のガイドラインがどのように変更しなければならないのかについて言及する。

## 試験結果の評価と追加試験の選択に関するケース・スタディ

降旗 千恵 東京大学 医科研・癌生物

現在、遺伝毒性試験の実行には標準セット（日本では Ames 試験と *in vitro* 染色体異常試験と *in vivo* 小核試験の三点セット）が推奨されている。しかしながら、被験物質の特性から標準セットでは遺伝毒性を示さないことが予想される時にはどのような追加試験の選択が可能だろうか。ケース・スタディとして "omeprazole" の例を紹介したい。

Omeprazole (Fig. 1) はプロトンポンプ・インヒビター (H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase 阻害剤) で胃潰瘍の治療薬である。寿命まで長期間投与するとラット・マウスの胃底腺部にカルチノイドを誘発する。この副作用は、omeprazole が胃酸の産生を抑えることから、ガストリンの分泌を促進し、それが enterochromaffin-like cell (ECL cell) の増殖を促し、結果として ECL cell のカルチノイドを誘発すると考えられている。カルチノイドは一般的に良性腫瘍の場合が多いと考えられている。そのような事情から omeprazole の遺伝毒性の有無は特に関心を集めている。標準セットの Ames 試験と *in vitro* 染色体異常試験と *in vivo* 小核試験をはじめとしてその他の遺伝毒性試験が行われたが、陰性であった。Omeprazole は胃内の酸性条件で活性化されて反応を示すので、中性条件で試験するこれらの方法では陰性を示すことは予想されることである。また活性化された sulphenamide 型は不安定なので、あらかじめ sulphenamide 型を単離して遺伝毒性試験を行うことも難しい。

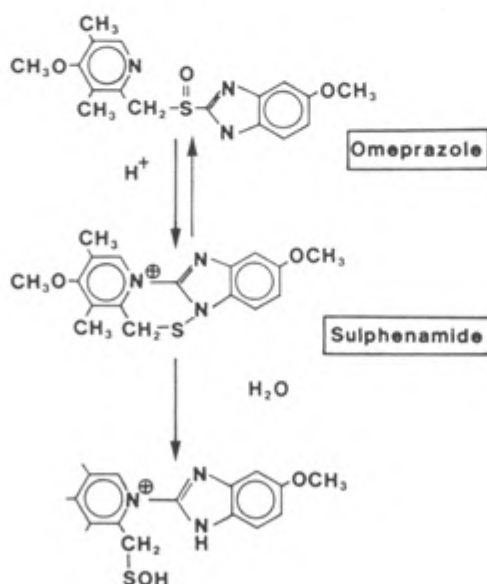


Fig. 1 Structure of omeprazole and its activation in acid.

そこで私達は、ラットに胃チューブで omeprazole を投与し、酸性条件で活性化して胃粘膜での遺伝毒性を調べた。指標として不定期 DNA 合成 (UDS) と DNA 一本鎖切断を用いた。

UDS 試験では 1 群 5 匹の 8 週齢 F344 雄ラットに 0.5% カルボキシメチルセルロース・ナトリウム塩、pH 7.0 に懸濁した omeprazole を胃チューブで投与し、4 時間後に屠殺して、胃幽門腺部粘膜を切り取り、*in vitro* で  $^3\text{H}$ -thymidine 存在下に複製 DNA 合成阻害剤の hydroxyurea (HU) 添加と無添加で 2 時間培養した。組織から DNA を抽出して、液体シンチレーションカウンターで放射能を測定し、UDS と複製 DNA 合成とを算出した。陰性対照群には溶媒を投与した。体重 1 kg 当たり 30, 100 mg の用量で omeprazole は陽性の結果を示したので報告したが (Fig. 2)、その後異なる lot では陰性のこともあり、現在総合判定で疑陽性 (equivocal) としている。

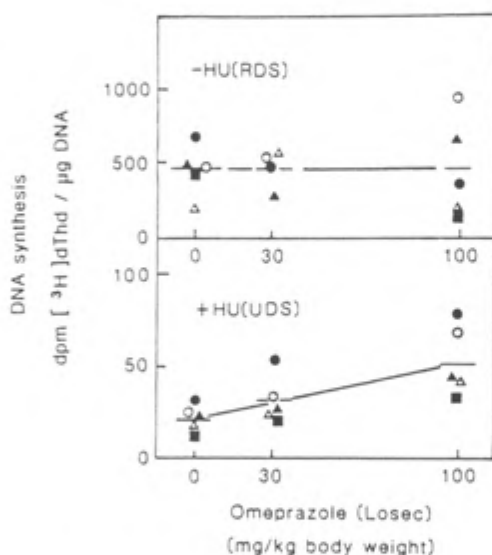


Fig. 2 UDS in the stomach pyloric mucosa in male F344 rats 4 h after oral administration of omeprazole. Points show results of individual rats. Bars show mean at each dose. The same marker shows the result of the same rat in the presence and absence of HU at each dose. Values in the presence of HU at a dose of 100 mg/kg bw were significantly different from those at 0 dose by Student's t-test ( $p < 0.05$ ). (Furihata, C., et al., Mutation Res., 262, 73-76, 1991.)

DNA 一本鎖切断は 1 群 8 匹の 8 週齢 F344 雄ラットに、5 匹には omeprazole を、陽性対照 1 匹には 4-nitroquinoline 1-oxide, 陰性対照 2 匹には蒸留水を胃チューブで投与した。2 時間後に屠殺して胃幽門腺部粘膜を削り取り、lysis 液で処理し、pH12.1 のアルカリ条件でフィルターから溶出した。体重 1 kg 当たり 30-500 mg の用量で合計 9 回調べたが、陽性の結果を示す時と、陰性の時とあった。9 回の結果を総合すると Cochran-Armitage binomial trend test で統計学的には有意となったが、はっきりした用量相関を示さず、平均値の上昇が高々 2.5 倍であったので総合判定で疑陽性 (equivocal) とした (Fig. 3)。はっきりとした結果にならない原因の一つは、omeprazole が胃内で沈殿するためかもしれない。

また、英国の Institute of Cancer Research の Phillips らは  $^{14}\text{C}$ -omeprazole をラットに経口投与し 1 時間後に胃幽門腺部粘膜で 36 pmol omeprazole/mg DNA の結合を検出した。しかし DNA adduct は確認できず、非共有結合を示唆した。

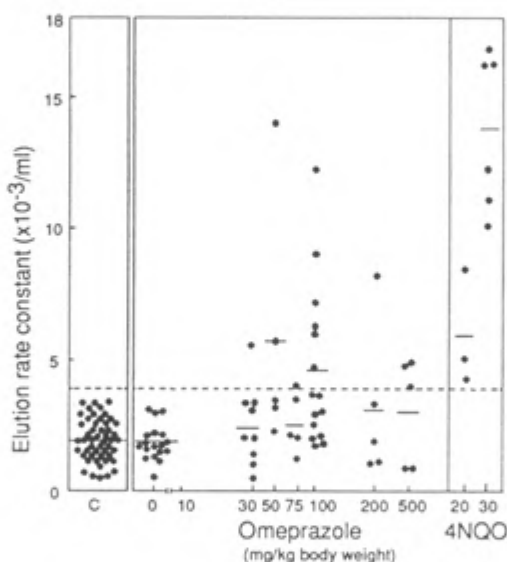


Fig. 3 DNA single strand scission in the stomach pyloric mucosa of male F344 rats 2 h after omeprazole administration. Points show results of individual rats. Bars show mean at each dose. C means historical controls. Dashed line suggests a border line of control group (mean + 2.6 SD). 4NQO is a concurrent positive control. Results of omeprazole are significantly different from control by Cochran-Armitage binomial trend test ( $p < 0.01$ ). (Furihata, C., et al., Mutation Res., 368, 1-6, 1996.)

## 試験の標準セットの論議の焦点は？

島田 弘康 第一製薬 安全性研究所

遺伝毒性試験における試験の標準セットの中で論議の焦点となっているマウスリンフォーマ試験 (MLA) は、哺乳動物細胞で遺伝子突然変異と染色体異常の両方を検出できる試験系として特にFDAが強く推奨している試験である。また、欧州諸国では哺乳動物細胞を用いる遺伝子突然変異試験(MCGM test)が従来から実施されており、申請に必要な標準組合せとしては、日本の3点セット (復帰突然変異試験、in vitro染色体異常試験(CA)および骨髄小核試験) にMCGM testを加えた4点セットを要求している (Table 1)。

Table 1 Standard Battery of Genotoxicity Tests

TEST CATEGORY	JAPAN	EU	USA	
Reverse mutation in bacteria	●	●	●	●
Mouse lymphoma tk assay		●	●	
Mammalian cell gene mutation				●
Chromosome damage in vitro	●	●		●
Chromosome damage in vivo	●	●	●	●

ところで、日本ではMLAを含む哺乳動物細胞での遺伝子突然変異試験の実施経験が少なく、欧米の主張するMCGM testの必要性に対して正当に反論することができない状況であった。そこで、厚生省と製薬協が共催し、(1) MLAが標準セットの一試験として適切かどうか、(2) MLAが染色体異常誘発物質をどの程度検出できるのかを主目的として、MLAに関する共同研究を1994年から1995年にかけて2回実施した。第1回目の共同研究には49機関 (国内42, 国外7) が、第2回目には46機関 (国内40, 国外6) が参加し、染色体異常誘発物質を中心に合計40の化合物についてマイクロプレート法により評価した。その結果、染色体異常誘発物質のMLA陽性率は19/34 (55.9%)であり、評価の確定しなかった6化合物を除くと19/28 (67.9%)であった。また、MLAでは遺伝子突然変異は大きなコロニー、染色体異常は小さなコロニーとしてそれぞれ検出できると理論的に説明されているが (Fig. 1)、共同研究の結果もこれがある程度支持するものであった (Table 2)。

Table 2 Analysis of Colony Size

MLA	Chemicals with increasing of small colonies (%) <sup>1)</sup>		
	CA positive		CA negative
	Structural ab.	Polyploidy	
Positive	66.2	50.0	25.0
Negative	33.3	26.7	21.4
Inconclusive	62.5	62.5	25.0

<sup>1)</sup> Significant or more than 20% increase of small colonies compared with solvent control.

これら共同研究の結果は3時間処理のプロトコールによるものであり、ここで陰性あるいは結果の不確定だった10化合物について24時間の薬物処理を行うとそのうち7化合物が陽性となり、またそれらの結果を含めたMLAの陽性率は89.7%であった。このことから、処理時間のプロトコールを工夫することによりMLAはほとんどの染色体異常誘発物質を検出できることが明らかになり、in vitroの染色体異常試験とMLAは感受性において同等であることがICHにおいて合意されつつあり、Table 3に示すような3-test batteryがICH遺伝毒性試験の標準セットとして提案されている。ただし長時間処理により偽陽性が増える可能性も懸念されており、これについて早急に検討が必要であるとされている。

Table 3 Standard Battery for ICH Genotoxicity Tests

1) A test for gene mutation in bacteria
2) An in vitro test with cytogenetic evaluation of chromosomal damage with mammalian cells or an in vitro mouse lymphoma tk assay
3) An in vivo test for chromosomal damage using rodent hematopoietic cells

MLA共同研究の結果およびその後の検討から、MLAは大部分の染色体異常誘発物質を検出し得ることが明らかになったが、処理時間以外にも最高用量の設定方法、duplicationの必要性等プロトコールに改良の余地があることも明らかになった。また、MLAで評価した40化合物について、文献より得た各種細胞での染色体異常試験結果とMLAの結果を比較解析したところ、欧米で主流のCHO細胞系と日本で推奨されているCHL細胞系では感受性がかなり異なることが指摘され、これには主として処理時間、観察項目等のプロトコールの違いが関与していることが明らかにされている (Table 4)。

Table 4 Summary of the 6 Mammalian Test Systems

Test system	No. of chemicals	No. of positives (%)	Concordance with carcinogenicity (%)
Gene mutation			
MLA	33*	21(63.6)	70.0 (14/20)
HPRT	13	3(23.1)	28.6 (2/7)
Chromosomal aberration			
CHL	32	28(87.5)	77.8 (14/18)
CHO	27	14(51.9)	50.0 (10/20)
HL	15	14(93.3)	100.0 (8/8)
V79	12	11(91.7)	83.3 (5/6)

\*Excluding inconclusive chemicals

なお、ICHガイドラインでは、バクテリアでの試験が不適切あるいは哺乳動物細胞に特異的に作用するもの、既知の変異原と構造相関をもつもの、新規の構造・薬理作用を有するもの等については、標準セットのオプションとしてそれぞれに適した試験系での評価が提案されている。

以上、今までの経緯も含めてICH遺伝毒性試験における標準セットの論議の焦点について述べる。

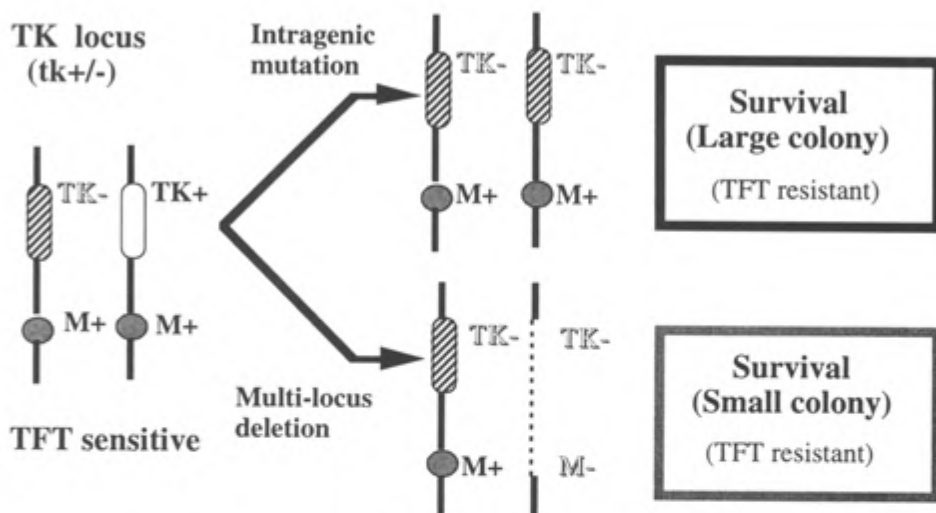


Fig. 1 Possible events occurring at the tk locus (TFT sensitive). M is hypothetical essential gene neighboring the tk gene (Evans et al., 1987).

## セッション4 がん原性試験

司会： 高橋 道人（国立衛試）、増田 裕（三共）

### がん原性試験検討班

リーダー	高橋 道人	国立衛生試験所 病理部
	増田 裕	三共 総合研究所
委員	青木 豊彦	エーザイ安全性研究所
	今井田克己	名古屋市立大 医学部
	白居 敏仁	ヤンセン協和 研究開発本部
	西川 秋佳	国立衛生試験所 病理部
	福島 昭治	大阪市立大学 医学部
	真板 敬三	残留農薬研究所
	三森 国敏	国立衛生試験所 病理部
	務台 衛	三菱化学 横浜総合研究所



## がん原性試験に用いる動物種

白居 敏仁 ヤンセン協和 研究開発本部  
増田 裕 三共 総合研究所

1991年に開催されたICH 1に於いて毒性試験法の一部としてのがん原性試験のトピックスに関する討議が始まり日米欧における規制についての比較検討が行われた。先ず最初に問題になったのは、げっ歯類を用いる長期がん原性試験に於ける投与量設定の問題であった。医薬品は特異な薬理作用を有する化合物でありその多くは直接的な遺伝子損傷作用はないが過去20数年にわたり実施されたがん原性試験の結果は略50パーセントの陽性率を示している事から、その発癌機序の研究が広範に行なわれ、げっ歯類に比較的特異的なメカニズムが多くある事、と同時に非常に高用量の投与に於いて腫瘍の陽性率が高い事も判って来た。この当時医薬品のがん原性試験の最高用量については日本及びヨーロッパでは臨床適用量の百倍という規定が存在し、一見科学的では無いように見えるが、従来の試験データから合理的に採用されていたエンドポイントであった、米国FDAはMTD（最大耐量）を唯一のエンドポイントとしていたためげっ歯類に毒性を発現しない医薬品については極端な高用量の投与をする事になりヒトには外挿し難い腫瘍の発生機序が多い事も判ってきた。MTD以外に体内動態等を考慮し医薬品の体内曝露ことに血中濃度（AUC）に重点をおいたエンドポイントを採用することを討議し同時に他のエンドポイントも加えて用量選択のガイドライン（S1-C）は2年後のICH 2に於いてステップ2の合意をした。

がん原性試験の必要、不必要な医薬品に関するガイドライン（S1-A）についての検討も行われて来ており、発がん性の懸念のある化合物、臨床投与期間（6か月以上）、抗癌剤に関する規定、生体内物質に関する規定等を盛り込んで数年間の検討の後1995年ICH 3に於いてステップ4の調印となった。

医薬品の長期がん原性試験に関して根本的な見直しの要請が起りICHの活動とあいまって、ラット及びマウスの莫大な資源と時間を費やした長期がん原性試験成績から上述のように略50%の陽性成績が得られ多数のラット、マウスの発癌物質が検出されたが、これらが十分にヒトの危険を予測する価値が有るや否やについて再検討が行なわれた。このトピックス（S1-B）は最初2年間の長期がん原性試験にラットとマウスの2種が必要で有るかを検討するトピックであったがその後検討が進むに従って他のICHのトピックスとは異なり日米欧の規制の違いを調和するのではなく、従来の試験成績の解析と発癌のメカニズムに関する科学的、実験的な進歩に出来るだけ沿って医薬品の発癌性を予測しうる試験系を探そうという内容に変わってきた。日米欧のがん原性試験のデータベースの解析からマウスの試験成績はラットに比べて危険性評価の価値が低い事、腫瘍発生の感受性はラットがマウスの倍高い事が示され例えば日本製薬協の99の医薬品のがん原性試験の成績では44の化合物がラット及び又はマウスに有意な腫瘍を誘発し、そのうち12の化合物はマウスのみにも腫瘍原性であった。マウスの腫瘍の50%は肝の腫瘍であり、次いで乳腺、下垂体等内分泌臓器であった。これらマウスの腫瘍はその後の開発の進行に影響をせず医薬品として承認されている。同様な傾向が欧米のデータでも示された。発癌性の評価は出来るだけ多くの情報から評価するべきでありマウスの長期試験も種間の感受性の差、weight of evidence、から全く無駄では無いが、長期の試験は原則としてラット一種のみで実

施し同時に三つの中期短期試験から一つを評価系として選択しうる事、更に全く新規化合物等の評価には従来のマウスの長期試験を他の試験として加えてもでもよいと柔軟性を持った内容になった。in vivo で腫瘍のエンドポイントを有する三つの短期、中期発癌性試験は以下の如くである。

- 1) ラットを用いる肝部分切除を行うイニシエーションプロモーションモデル
- 2) がん遺伝子、がん抑制遺伝子等の遺伝子操作動物モデル (トランスジェニックマウス)
- 3) 新生児動物モデル (新生児マウス)

現時点では1)のモデルはともかくトランスジェニックマウス、新生児マウスの両モデルについては試験成績の確認保証が充分得られていないために試験成績の解釈に問題が生ずると懸念する意見もあったが、このガイドラインの目指す所は今後出てくるであろうこれらの試験成績の積み重ねからこれらのモデルの有用性の評価を行って行こうというものである。更に、今後の科学の進歩により更に有用な試験法の採択も将来有り得る事も本ガイドラインには述べられている。本ガイドラインは1996年5月にステップ2の合意に達した。

今回のシンポジウムではイニシエーションプロモーションモデル、トランスジェニックマウスモデル、新生児動物モデルそれぞれについて問題点の討議を行うのでここでは新生児動物モデルについての試験条件、その結果等から問題点を考察する。

一般的にはマウスが用いられる事が多く、ICR、CDF1マウスの報告例が多いが、分娩後24時間以内或は化合物により1日目、7日目及び15日目等に分割して、あらかじめ予備試験で決めた最大耐量を皮下或は腹腔内に投与し離乳後一年間の飼育観察を行い剖検し病理組織学的な診断をし発癌性の検定をする。F U J I I、K (1991)によればラット、マウスの長期癌原性試験との一致率は83.5%と報告されている。問題点は遺伝子障害性の化合物では陽性の一致率は高いが、遺伝子障害性の無い化合物では一致率は極端に落ちる事である。例えばラットの肝発癌物質であるphenobarbital、また estradiol 等も一致しない。医薬品の多くは遺伝子障害性が無い化合物であることから医薬品の評価システムとして使えるか問題の有るところである。

その他の情報も加えて新生児マウスモデルについて考察する。

# トランスジェニック動物による発癌性評価

三森国敏、西川秋佳 国立衛生試験所 病理部

発癌性の代 *in vivo* 試験としては、新生児動物を用いた短期発癌試験や二段階発癌試験の他に、トランスジェニック (Tg) 動物を用いた短期発癌試験等が提案されている。これらの *in vivo* 試験の中で、発癌性評価のために使用されている Tg マウスとしては、*ras*、*myc*、*jun* 等の癌遺伝子を導入した Tg マウスや p53 のような癌抑制遺伝子をノックアウトした Tg マウス等があげられる。しかし、これらのうちで、実験動物として供給体制が整っているものは少なく、我国では、ヒトプロト型 *c-Ha-ras* 遺伝子導入 Tg マウス、*v-Ha-ras* 遺伝子導入 Tg マウスや p53 ノックアウトマウスが入手可能であり、その短期発癌試験系としての検証のための実験も進んでいることから、本シンポジウムでは、この三者についての Tg マウスの特徴、有用性や問題点について紹介する。

## 1. ヒトプロト型 *c-Ha-ras* 遺伝子導入 Tg(rasH2) マウス

rasH2 マウスはヒトプロト型 *c-Ha-ras* 癌遺伝子を導入した腫瘍モデルマウスであり、系統名は (BALB/cByJxB6rasH2/Tg)CB6F1 である。本マウスはホモ個体が得られないため、導入遺伝子をヘテロにもつ C57BL/6JclTg 系雄マウスと既知の非導入近交系 BALB/cByJ 系雌マウスとを戻し交配することにより実験動物中央研究所において系統維持されている。rasH2 マウスを用いた発癌性試験の短期化の試みは、平成4年から我国では実施されてきている。この研究においては、遺伝子障害性発癌物質として、4-nitroquinoline-1-oxide(4NQO)、cyclophosphamide(CP)、diethylnitrosamine(DEN)、N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG)、N-methyl-N-nitrosourea(MNU)、methylazoxymethanol(MAM) 等が、非遺伝子障害性発癌物質として砒素、ethylenethiourea(ETU) 等が選択され、これらを rasH2 マウスおよび非導入マウス(non-Tg マウス) に投与し、最長 26 週まで観察したところ、遺伝子障害性発癌物質を用いた実験では、その被験物質により標的臓器は異なっていたが、rasH2 マウスでは皮膚、肺ないし前胃等に悪性度の高い腫瘍が non-Tg マウスに比べ、早期かつ高率に誘発されたと報告されている。一方、非遺伝子障害性発癌物質を用いた実験では、rasH2 マウスに腫瘍の発生は認められなかったが、毒性病変については他の通常の動物においてみられるものと同様な臓器特異性を示した。このように、rasH2 マウスは、遺伝子障害性発癌物質の癌原性の検索には有用な動物であることを示唆するデータが得られている。さらに、現在、40以上の化学物質について、rasH2 マウスを用いた短期発癌試験系が発癌性の検出に有用か否かに関する検討が進行中であり、来年の ICH4 までにはこのマウスの発癌性評価における有用性に関するデータが集積されるものと思われる。

## 2. *v-Ha-ras* 遺伝子導入 Tg マウス

この系統の Tg マウスはその連結されるプロモーターやエンハンサーの種類により、用途が異なっている。プロモーターとしてマウス乳腺腫瘍ウイルス (MMTV) を連結したものでは、無処置のまま飼育することによっても乳腺やハーダー腺腫瘍が高率に自然発生することが知られており、現在発癌性検出の系としてはあまり使用されていない。TG.AC マウスは、ホモの *v-Ha-ras* に胎児  $\alpha$ -グロブリンをプロモーターとして連結した Tg マウスであり、米国 Taconic Farms で

その親となる wild-type のFVB/N 系マウスと共に系統維持されている。このマウスは、皮膚発癌のTgマウスモデルとして開発されたものであり、米国国立環境衛生科学研究所 (NIEHS)のTennant らはこのマウスの皮膚に種々の発癌物質 (benzene、benzethonium chloride、2-chloroethanol、ethyl acrylate、mirex、phenol 等) を短期間投与することにより、このモデルが非 遺伝子障害性発癌物質の検出に有用であることを見いだしている。

### 3. p53 ノックアウトマウス

このマウスはp53癌抑制遺伝子を遺伝学的にノックアウトしたものであり、ホモ個体とヘテロ個体が米国 Taconic Farms で系統維持されている。ホモ個体においては、無処置で飼育しても生後6ヶ月までに悪性リンパ腫の発生により死の転帰をとるものが多いため、発癌性評価にはそのヘテロ個体 (p53+/-) が使用されている。米国 NIEHS の Tennant らは、National Toxicology Program (NTP) で実施した2年間の発癌性試験で陽性を示した化学物質 (4-vinyl-1-cyclohexene diepoxide、p-cresidine、p-anisidine、N-methylolacrylamide、reserpine) について、この p53+/- マウスを用いて6ヶ月未満の投与実験を行ったところ、遺伝子障害性発癌物質の検出にこのマウスモデルが著しく感受性が高かったことを報告している。さらに、彼らはその他の多くの遺伝子障害性発癌物質についてもこの系を用いて短期実験を継続しており、このモデルの有用性についての実験データが今後集積されるものと思われる。

このような成績から、米国 NIEHS では、TG.AC マウスと p53 ノックアウトマウスの両系統マウスを用いた発癌性予測のための短期発癌スクリーニング法が提案されている。しかし、これらの試験法は、2年間のマウスを用いた発癌性試験に代わる短期発癌試験法として開発されたものではなく、このスクリーニング法で陽性結果が得られたならば、被験物質の動物種を超えた発癌性の可能性があるか否かを明らかにするために、今までと同様の2年間の発癌性試験を更に実施する旨が明確にされている。この点は、ICHが目標としているげっ歯類1種+代替 in vivo 発癌試験による発癌性評価と根本的に異なるところである。

### 4. 問題点

上述のような実験成績から、rasH2 マウスは、p53 ノックアウトマウスと同様、遺伝子障害性発癌物質の癌原性の検索には有用な実験動物であることが示唆される。一方、非遺伝子障害性発癌物質の検索に関しては、TG.AC マウスは、その皮膚発癌プロモーション作用を早期に検出する目的に適したモデルと考えられる。しかし、一種の Tg マウスのみを用いて全ての発癌物質を検出することは、今のところ困難であり、また、その直接発癌メカニズムやそのプロモーション作用メカニズムを明確にするための研究は現在それほど進んでいない。今後、この領域に関する Tg マウスを用いた研究が不可欠である。

## 中期発癌性試験法 (Initiation-Promotion Model) による 発癌性の評価

今井田克己 名古屋市立大学 医学部 第一病理  
福島 昭治 大阪市立大学 医学部 第一病理

ICHにおいて提唱された Initiation-Promotion Model いわゆる中期発癌性試験法について、その概略と有用性、およびその評価について解説したい。この試験法は長期発癌性試験とAmes 試験法をはじめとする短期スクリーニング法の間位置する動物を用いた比較的短期間の発癌物質検出法で、これには肝中期発癌性試験法と多臓器発癌性試験法があるがここでは肝中期発癌性試験法を中心に述べる。

### 【肝中期発癌性試験法】

この試験法ではラットの肝を用いているが、ラットの肝はスクリーニング法の標的臓器として最適といえる。その理由は、まず、肝は発癌過程が詳細に検討され、組織学的に容易に判別できる前癌病変が確立しており、また、発癌2段階説に基づいた方法論が十分に検討され、短期間に肝の前癌病変を作成することができ、さらに発癌性の認められている物質の多くが肝を標的臓器の一つとしていることなどがあげられる。

### 〔実験方法〕

図1にこのラット肝中期発癌性試験法の実験デザインを示す。



図1. ラット肝中期発がん性試験法のプロトコール

6週齢の雄F344ラットを用い、動物を基本的に3群に分ける。第1群は実験群で、生理食塩水に溶解した diethylnitrosamine (DEN)を体重1kg当たり200mgの割合で、単回腹腔内投与し2週間無処置で処理した後、被験物質を6週間投与し8週で屠殺剖検する。第2群は被験物質を投与しない対照群である。第3群はDENの代わりに生理食塩水のみを投与し、被験物質を6週間投与する群である。なお、被験物質の投与開始後1週間後に全群2/3肝部分切除を行なう。被験物質の投与方法は発癌性試験を実施する時と同じ観点で選ぶが、飼料に添加し経口投与することが多い。屠殺後、肝の右葉と尾状葉から3スライスを切り出し、冷アセトンで、固定後、パラフィン包埋を作製し、胎盤型グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST-P)免疫組織化学染織を行なう。そして認められたGST-P陽性細胞巣を画像処理装置を用いて、その面積、個数を計測し、単位面積当たりの面積、個数を算出する。その結果を第1群と第2群の間で比較検討し、統計学的に有意にどちらかの値が上昇したものを陽性とする。

### 〔結果〕

現在までに、269の化合物についての検索を終了している(表1)。その結果、肝発癌物質は変異原性の如何を問わず、高い陽性率を示している。肝発癌物質と報告されている物質で陰性のものの多くは高脂血症剤である clofibrate などペルオキシゾーム増生作用のある物質で、これら物質はGST-Pを誘導しないことが知られており、この陽性巣を指標とする本試験法で検出されないのが主な原因である。これらの物質の場合には通常のHE染色を用いて過形成巣を計測する必要がある。

表1 269化合物の検索結果

検索物質	Ames 試験						合計
	+		-		未知		
肝発癌物質	30/31	(97) <sup>a</sup>	26/31	(84) <sup>b</sup>	1/1	(100)	57/63 (90)
肝以外の発癌物質	7/25	(28)	3/14	(21)	0/2	(0)	10/41 (24)
非発癌物質	0/6	(0)	2/37	(5) <sup>c</sup>	0/2	(0)	2/45 (5)
未知	3/13	(23)	29/79	(36)	10/28	(36)	42/120 (35)
合計	40/75	(53)	60/161	(37)	11/33	(33)	111/269 (41)

<sup>a</sup> 陰性物質 4,4'-Diaminodiphenylmethane (DDPM)

<sup>b</sup> 陰性物質 Clofibrate, Di(2-ethylhexyl)adipate (DEHA), Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP), Trichloroacetic acid (TCA), Tamoxifen

<sup>c</sup> 陽性物質 Malathion, Vinclozolin

## 〔まとめ及び問題点〕

このラット肝中期発癌性試験法は多くの発癌物質がその標的臓器としている肝に対する発癌性を変異原性の有無にかかわらず、比較的短期に予測可能であり、前癌病変を指標とするため、偽陽性や偽陰性が極めて少なく、また、検索物質の量が少なくすむなど、多くの長所があり、本試験法は発癌物質の早期検出および発癌機構の解明に極めて有用であるといえる。しかし、前述のように、1) ペルオキシゾーム増生物質などGST-Pの発現を抑制する物質の検索には注意が必要である点や2) 肝以外に発癌標的性を示す物質の検索には必ずしも適さない点、また、3) 肝部分切除というやや経験を必要とする手術を行う必要があるなど、問題点もちろんある。また、この方法は主にプロモーション作用を検索する系であるので、陽性として検出された場合には被検物質の遺伝子障害作用の有無などの研究を行って、被検物質の発癌性を総合的に評価する必要がある。

## 【多臓器中期発癌性試験法】

肝中期発癌性試験法による肝以外の臓器を標的とする発癌物質の検出率は、肝の前癌病変を指標としているから当然低い。そこで、我々は種々の臓器について発癌性評価を比較的短期間に判定可能な多臓器中期発癌性試験法も開発してきた。ここではその概要だけ述べる。

## 〔方法〕

5種類の異なった臓器を標的とする発癌物質を短期間の間に集中的に投与し、肝だけでなく全身諸臓器の前癌病変を検索する方法である。

## 〔まとめ及び問題点〕

この方法は、ラット肝中期発癌性試験法と比較して、1) 28週間の実験期間を要し、2) 全身諸臓器の標本作製と病理組織学的検索が必要であるなど、マイナスの要因はもちろんあるものの、多臓器の発癌性を単一の個体で検索可能である。

## 中期発癌性試験法 (Initiation-Promotion Model) による評価の事例

務台 衛 三菱化学 横浜総合研究所  
青木 豊彦 エーザイ 安全性研究所

ICHのガイドライン草案 (S1B) では、医薬品のがん原性を「1動物種による長期がん原性試験」と2段階発がんモデル等の「in vivo 短/中期発がん試験法」によって評価できることになっている。

本報告では、利尿剤であり non-genotoxic carcinogen として知られている Spironolactone (SPL) を例にとり、2段階発がんモデルを用いたがん原性評価における実験モデルの選択から試験成績の解釈 (発がん機序の検討) までの流れをシミュレーションすることにより、医薬品のがん原性評価における本モデルの応用の可能性を示したい。併せて、ICHガイドライン施行後の医薬開発プロセスにおけるがん原性評価のタイミングについても考えてみたい。

### (1) 実験モデルの選択

2段階発がんモデルの特徴は、使用するイニシエーターの臓器標的性によって検索可能な臓器が決定されることである。このため、実験モデルの選択に当たっては、被験物質の毒性プロファイル (臓器標的性) を考慮する必要がある。SPLの場合、ラットを用いた亜急性毒性試験において肝臓および甲状腺の重量増加、肝細胞および甲状腺濾胞上皮細胞の肥大が認められたが、その他の臓器・組織には、発がんに関与する可能性のある変化は見られなかった。したがって、SPLのがん原性評価に当たっては、肝臓あるいは甲状腺のがん原性を検討するために2つの実験モデル - Diethylnitrosamine を用いる2段階発がんモデルである中期肝発がん試験 (実験期間: 8週間) と Dihydroxypropylnitrosamine をイニシエーターとする甲状腺2段階発がん試験 (同: 12週間) - を実施した。

### (2) 用量の選択

2段階発がんモデルでは、一般毒性試験と同じ動物種・システムを使用できるため、長期がん原性試験と同様の用量選択が可能である。SPLの場合は、軽度な体重増加抑制が見られる 2000ppm (混餌投与) を最高用量として、雄ラットを用いて2つの2段階発がんモデルと長期がん原性試験により発がん性を検討した。

### (3) 実験結果

SPLの中期肝発がん試験 (用量; 1000, 2000ppm) では、高用量でGST-P陽性細胞巢の軽度な増加が見られたが、低用量では対照群と同等の成績であった。また、甲状腺2段階発がん試験 (用量; 200, 600, 2000ppm) では中用量以上で濾胞上皮の増殖性病変 (過形成・線種/腺癌) の用量相関的な増加が見られ、SPLの甲状腺発がんプロモーション作用の閾値は 200ppm 付近にあるものと考えられた。



長期がん原性試験（用量；670, 2000ppm）では、高用量で肝細胞腺腫と甲状腺濾胞上皮腺腫／腺癌の発生頻度の増加が認められたが、その他の腫瘍の発生頻度に投薬の影響は見られなかった。長期試験におけるこれらの腫瘍性病変の発現用量や用量相関は、2段階発がんモデルにおける肝GST-P陽性細胞巢や甲状腺濾胞上皮の増殖性病変のそれとほぼ一致していた。

#### （4）発がんプロモーション作用の機序検討

2段階発がんモデルによる検討と並行して、SPL投与下の肝細胞増殖動態をBrdU標識法で、肝臓における甲状腺ホルモン（T4）の代謝亢進を肝UDP-GT活性と胆汁中のT4（抱合体）量の測定により検討した。その結果、SPL投与による肝細胞のBrdU標識率の上昇、肝UDP-GT活性上昇および胆汁中のT4量増加が認められ、投薬により肝臓および甲状腺に増殖刺激となり得る負荷が掛かっていることが示唆された。特に、甲状腺に関しては、T4の代謝・排泄の亢進と2段階発がん試験の成績に一致した用量相関性が見られた。この成績は、TSHを介したindirectな甲状腺への増殖刺激と甲状腺発がんの関連性を示唆しており、SPLの甲状腺発がんプロモーション作用の解釈および評価に有効なデータになるものと考えられた。

#### （5）まとめ・今後の問題点

上述のSPLのように、2段階発がんモデルは長期試験との成績は相関性が高いと考えられる。したがって、反復投与毒性試験の成績等から予測される発がん標的臓器におけるがん原性の検討に有効な実験モデルである。また、長期試験と2段階発がん試験を比較した場合、後者は試験規模（期間・動物数・総コスト）が長期試験に比べはるかに小さいため、多用量を選択し詳細な用量相関性を検索すること、あるいは機序検討試験と並行して実施し発がんのトリガーと増殖性病変発生の相関を検討することが可能である。これら2段階発がん試験法の利点は、長期がん原性試験の補完試験として有効なだけでなく、これまで医薬開発の後期に実施することの多かった動物実験による発がんポテンシャルのリスクアセスメントを開発の比較的早い段階で行うことを可能にし、臨床試験に供する安全性情報の充実にも繋がるものと考えられる。

一方、本モデルを広く医薬品のがん原性評価に応用する際には、いくつかの問題点もある。その一つは、実験モデル（使用するイニシエーター）の選択や陰性成績を保証するための陽性対照物質についての基準が定まっていない点である。特に、被験物質の臓器標的性が明らかでない場合、実験モデルの選択および陽性対照物質の設定の正当性が、試験成績を解釈する上で重要な検討事項になるものと考えられる。その他にも、適正な試験規模（期間・動物数）、雌雄両性を使用するか片性でも可とするか、前腫瘍性病変の診断クライテリア等についても議論を深め、各方面の認識を共通にする必要がある。

今後ICHガイドライン（S1B）の討議と並行して、これらの詳細な点についての検討を進めなければならないものと思われる。

## 今後の問題点

高橋 道人 国立衛生試験所・病理部  
真板 敬三 残留農薬研究所

ICHでは、現行のラット、マウスの2種の動物を用いた長期がん原性試験の実施の意義について検討した結果、マウスの長期試験の意義を認めるものの、必ずしもその必要性については疑問視された。今回ステップ2で合意された案では、非遺伝毒性物質の場合、特に感受性等においてマウスを選択しなければならない理由がない限り長期発がん性試験はラット1種でよいとされ、その代わりに短・中期のin vivo 発がん実験モデルを用いた実験を追加することとされた。ICHのガイダンス草案(S1B)によれば、2段階発がん実験モデル、トランスジェニック動物モデル、新生児げっ歯類モデルなどが挙げられている。いずれのモデルにも長所のほか、多くの短所があり、今後引き続き検討が必要であることは今回の各シンポジストの報告で明らかにされている。

トランスジェニック動物の有用性については、種々のがん遺伝子あるいはがん抑制遺伝子を組み込むことにより、早期に腫瘍を誘発させることが可能であり、試験期間を短期化させる利点がある。しかし、陽性結果がでた場合のメカニズム解明が必ずしも容易ではないこと、動物の入手に問題があること、非遺伝毒性発がん物質についての実験データが少ないこと、などの問題点がある。次に、2段階発がんモデルについては我が国で主に実験が進められ、多くのデータの集積がありバリデーションについても最も進んでいると考えられる。この実験系は動物の入手においては特に問題はないと考えられるが、主に肝臓を標的としていること、発がん物質を用いること、肝切除術のような手術が必要なこと、などの問題点が指摘されている。新生児動物モデルについては、動物の入手が容易であること、被験物質が少量で済むこと、等メリットが多く注目される場所ではあるが、新生児期に投与すること、投与経路が限定されること、観察期間が1年と長いこと、バリデーションが十分でない、など解決すべき問題点も多い。

## セッション5

### トキシコキネティクスと反復投与組織分布試験

司会： 大野 泰雄（国立衛試）、堀井 郁夫（日本ロシユ）

#### トキシコキネティクス検討班

リーダー	津田 充宥 堀井 郁夫	国立衛生試験所 薬理部 日本ロシユ研究所 毒性病理部
委員	相澤 一雅 五十嵐俊二 岡田 惇也 野田 耕世 杉山 雄一 矢部 友邦、 杠 輝昭	明治製菓 薬物動態研究所 エーザイ 東京研究所 武田薬品 分析代謝研究所 藤沢薬品 安全性研究所 東京大学 薬学部 日本ベーリンガー 実験病理学部 エーザイ 薬事監査部

#### 反復投与組織分布試験検討班

リーダー	大野 泰雄 進藤 英世	国立衛生試験所 薬理部 三共 総合研究所
委員	粟津 莊司 大塚 峯三 中島 栄一 林 正弘 紅林 秀雄 溝尻 顕爾	東京薬科大学 田辺製薬 医薬開発研究所 三共 分析代謝研究所 東京理科大 薬学部 国立衛生試験所 薬理部 塩野義製薬 新薬研究所

# トキシコキネティクス試験の目的、デザインと統計解析： 日本製薬工業協会の事例データベース102試験の解析結果 について

五十嵐俊二 エーザイ 東京研究所  
矢部 友邦 日本ベーリンガー実験病理学部  
野田 耕世 藤沢薬品 安全性研究所

## 1. トキシコキネティクス試験の目的

医薬品の安全性評価のための実験動物を用いた毒性試験においては、ヒトにおけるその試験医薬品に想定される用法・用量を考慮に入れて、如何なる用量でどのような有害な作用（毒性）が発現するかを明らかにする。その毒性試験が、投薬方法や剤型調整において、適切に実施されたかどうか、動物試験結果のヒトへの外挿に際し、体重当たりの換算投薬用量ではなく、毒性試験の中で測定された試験薬剤あるいは代謝物の血中濃度（全身的暴露量）を指標とすることがトキシコキネティクスの目的であろう。

毒性試験の予備段階においてはバイオアベイラビリティ（吸収、初回通過効果）や生体内半減期、蛋白結合、それらの動物種差に関するおおよその情報が得られる必要があり、初期の毒性試験の中で血中濃度の用量相関や反復投与による血中濃度の経時変化が検討され、毒性試験デザインの妥当性が吟味され、後続の毒性試験が適切且つ効率的に実施されたいものである。

## 2. トキシコキネティクスのデータ解析手法について

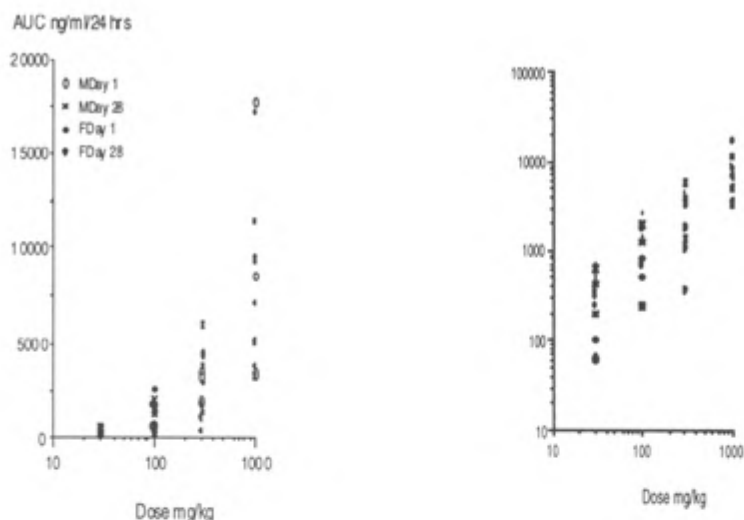
ICHでガイドラインが検討され始めて以来、日本の製薬企業各社はトキシコキネティクスの本格的実施に取り組み始めた。日本製薬協基礎研究部会では1994年度の活動の一環として会員企業の実施例を集め、問題点の抽出とより適切な試験のデザインの検討を進めてきた。調査結果については後述するが、個々のデータをどのように解析すべきかが大きな問題となった。以下の2点がトキシコキネティクスデータの統計解析上重要であり、また、効率的な試験のデザインに役立つであろう。

### 1) 分散分析

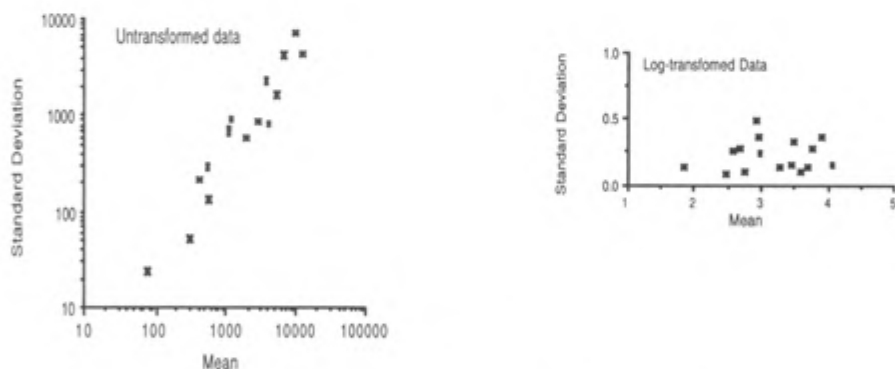
トキシコキネティクスの目的に照らし、試験用量と血中濃度の相関と反復投薬による血中濃度の経時変化の解明、並びに雌雄の性差の有無が検討される。各々の要因の影響やそれら要因の組合せによる特性（交互作用の有無）を総括的に評価する上で、分散分析が実践的な手法である。

### 2) 血中濃度データの対数変換

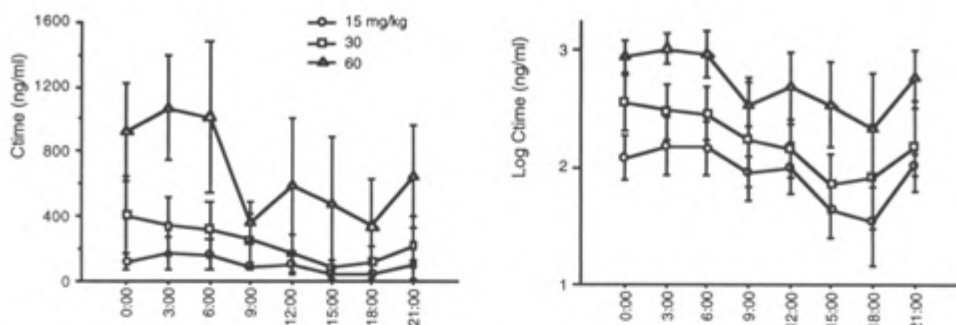
データの解析に先立ち、血中濃度データを対数変換することは以下の3点より望ましい。



**Fig. 1. Dose-concentration relation for AUC values (Case 29A).** Individual concentration data (ng/ml/24 hrs) determined on Days 1 and 28 in a total of 24 male and 24 female rats are plotted on a linear scale (left) and on a log scale (right).



**Fig. 2. Relation between mean and standard deviation (SD):** AUC values in a 4-week repeated dose study in rats (Case 029A). Plotted are mean and SD values calculated for 16 groups consisting of 3 replications each, i.e. both sexes of animals, 4 test dose levels (30, 100, 300, and 1000 mg/kg) and 2 occasions (Days 1 and 28). Note: SD is approximately proportional to mean, when data not transformed.

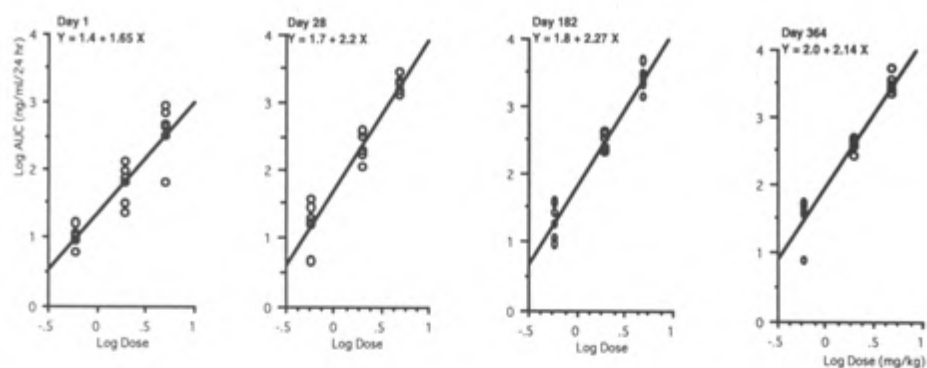


**Fig. 3. Time course of plasma concentration (ng/ml) determined in a 3 hour interval over 24 hours:** A dose-range finding study for carcinogenicity test in rats. The animals were given a diet containing Compound 051 at concentrations adjusted to levels 15, 30 and 60 mg/kg. Data are mean of 8 animals (4 males and 4 females) with standard deviation.

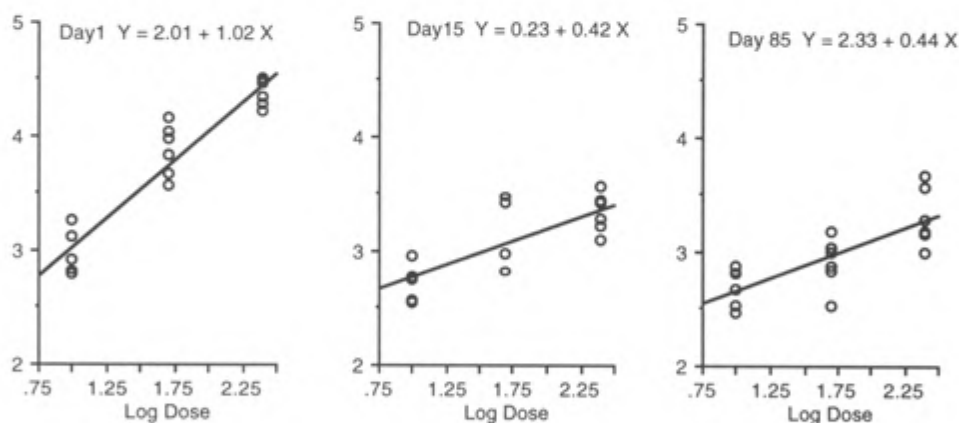
(1) 分散分析の適用に際し、比較検討される群間のデータのバラツキは等しい(等分散)ことが望ましい。しかし、血中濃度(Ctime、AUC)の平均値の大きさとそのグループの分散の大きさに比例関係があり、データの対数変換で不等分散を矯正できる(Fig.1、2)。対数変換して得られる平均値(幾何平均)は多くの場合、算術平均より小さいことに注意されたい。

(2) 経時変化や雌雄差等の表現は絶対値の差で捉えるよりも比で記述される方が分かりやすい(Fig.3、4、5)。例えば、Fig.3のラットを用いた混餌投薬試験における血中濃度の日内変動は、対数変換をした場合に、3試験用量間でパラレルであり、昼夜の差は3.3倍( $\text{Antilog}_{10}0.52$ 、平均値の差)であった。“ラットの雌雄差(雌>雄)は5倍であった”と表現される場合もあろう。

(3) トキシコキネティクスで解明されるべき最重要課題である用量との相関、即ち、nonlinear kineticsの程度が、対数用量と対数血中濃度の回帰分析の1次回帰係数により、定量的に評価できる。Fig.4の場合は、初回投与で用量が10倍増えると血中濃度が4.5倍( $\text{Antilog}_{10}1.65$ )に増加し、反復投与4週後には160倍( $\text{Antilog}_{10}2.20$ )と、更に、正のnonlinear kineticsの程度が強くなった事例であり、Fig.5の場合は、初回投与時にlinear kinetics(1次回帰係数  $b=1.02$ )であったが、反復投与後には酵素誘導に基づく、10倍の用量増加に対する血中濃度の増加は2.6倍( $\text{Antilog}_{10}0.42$ )と、顕著な負のnonlinear kineticsが生じた事例である。



**Fig. 4. Dose-concentration relation:** Case study 051A, a repeated dose toxicity study in dogs, where AUC (ng/ml/24 hr) was repeatedly determined. Dogs received Compound 051 at a dose level of 0.6, 2.0 or 5.0 mg/kg daily for 12 months, there being 3 males and 3 females per dose. Note: the linear regression coefficient was 1.65 (95% limit 1.26 - 2.04) on Day 1; indicating strongly positive non-linear kinetics, which became more marked by repeated dosing, e.g. when a dose level increases 10 times, the exposure levels increases 186 times (antilog<sub>10</sub> 2.28 = 186).



**Fig. 5 Dose-concentration relation:** A repeated dose toxicity study in dogs, where the exposure level (AUC, ng/ml/24 hr) was repeatedly determined. Dogs received Compound X at a dose level of 10, 50 or 250 mg/kg daily for three months, there being 3 males and 3 females per dose. Note: the linear regression coefficient was 1.02 on Day 1 but about 0.4 after repeated dosing; when a dose level increases 10 times, the exposure levels increases 2.5 times (antilog<sub>10</sub> 0.4 = 2.51).

**TABLE 1: Design of Toxicokinetic Case Studies Investigated**

Length of treatment	Dog	Monkey	Mouse	Rat
<b>Length of Repeated Dosing</b> (* includes carcinogenicity test)				
4 week or less	8	1	0	7
3 month	28	2	4*	19*
6 month	5	0	0	5
12 month	14	1	1*	7*
<b>Dose Levels Tested</b>				
2	4	0	0	3
3	41	4	4	24
4	10	0	1	11
<b>Number of Time-points (days) for Measurement</b>				
1	2	0	3	5
2	15	3	1	12
3	27	1	1	14
4	8	0	0	5
5 or more	3	0	0	2
<b>Number of Animals per Group</b>				
1	2	0	0	0
2	4	0	0	1
3	26	3	3	21
4	15	1	1	5
5	3	0	1	8
6 or more	5	0	0	3
<b>Total</b>	<b>55</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>38</b>

### 3. 日本製薬協のトキシコキネティクスの事例解析結果

日本製薬協基礎研究部会の会員企業から150試験に及ぶ実施例が個別データを添えて提供された。その内の経口反復投与毒性試験102事例の試験種、試験条件はT a b.1の通りであった。それらの試験データの分散分析並びに回帰分析の結果はT a b.2の通りであった。

### 4. 効率的な試験デザイン

ICHのガイドラインにはトキシコキネティクスのデータ解析に高度な(?)統計処理手法の必要のないことが明記されている。しかしここで紹介している統計手法は古典的な、基本的なものであるが、限られた動物数あるいはサンプル数の試験データから最大限に、包括的な結論を抽出するのに役立つであろう。即ち、効率的な試験をデザインする為の前提条件である。

#### 1) 必要な1群の動物数

トキシコキネティクスのデータ解析において2群の平均値の差のt検定は余り役立たない。例えば1群の動物数を6匹とし2群の比較における誤差の自由度は10となる。1群の動物数2匹(1動物から1サンプルのみと仮定する)



**TABLE 2: Summary of Statistical Analyses of Case Studies**

**(1) Sex differences**

Animal	No.difference	M > F	M < F	Total
Dog	39	1	6	46
Monkey	1	1	2	4
Rat	9	5	23	37
Mouse	2	1	2	5

**(2) Change during repeated dosing**

Animal	No change	Increase	Decrease	Total
Dog	28	20	5	53
Monkey	1	1	2	4
Rat	16	14	7	37
Mouse	1	0	0	1

**(3) Dose dependence**

Dose dependence was statistically significant in all 102 studies except one, a dose range finding study for carcinogenicity tests by feeding in rats .

Distribution of the regression coefficient (b) in dog and rat studies

Range of b	Dog Studies				Rat Studies			
	Ctime	%	AUC	%	Ctime	%	AUC	%
-0.1	0	0	0	0	1	3	0	0
-0.3	2	4	1	3	1	3	2	9
-0.5	4	7	3	8	5	13	0	0
-0.7	17	30	6	16	5	13	1	5
-0.9	5	9	8	22	10	26	5	23
-1.1	12	21	7	19	10	26	7	32
-1.3	12	21	5	14	1	3	3	14
-1.5	3	5	5	14	2	5	2	9
-1.7	1	2	1	3	1	3	1	5
-1.9	0	0	0	0	2	5	0	0
>1.9	0	0	1	3	0	0	1	5
Total	56	100	37	100	38	100	22	100

A regression coefficient between 0.7 and 1.3 could be regarded as not deviating markedly from linear kinetics: 95% confidence limits often allowed an interval of 0.2 on either side of the estimate.

で雌雄、3用量、2時点で試験するとすると、合計動物数は24匹で、分散分析の誤差の自由度は12であり、各要因並びに交互作用の有意性の検定がなされ、各要因の影響の大きさが自由度12の信頼限界をもって推定できる。1群3匹あるいはそれ以上の動物数は十分な精度の結論を提供するものである。

## 2) 血中濃度測定の頻度

AUCを算出するための採血ポイント数は1日1回投薬するのか複数の分割投与を行うのか、個々の薬剤に特有の吸収速度と持続性によって異なるであろうが、およそそのAUCの推定（把握）ができるものであれば充分であろう。混餌投薬の場合には24時間（日内）変動の平均値が無難に推定できるように、等時間間隔の採血が望ましい。

## 3) モニタリングとプロファイリング

毒性試験における全身的暴露量は血中濃度の高さと時間の積、即ちAUCで表現され、ヒトのデータとの対比もAUCデータで行われる。投薬後の任意の1時点の血中濃度データでヒトのデータと対比し難いので、投薬後の任意の1時点の血中濃度、例えば投薬2時間後のC<sub>time</sub>、を指標とするのは、ICHガイドラインで言う“モニタリング”に過ぎないが、用量相関、経時変化あるいは性差等の要因の影響の解析の目的ではAUCで得られると同様の精度の結論が抽出できる。1部の試験でAUCの測定でトキシコキネティクスを実施し、その他の試験ではモニタリングでその再現性を確認するのが効率的な試験の進め方であろう。

## 参考文献

- ICH Harmonised Tripartite Guideline (1994 a). Note for Guidance on Toxicokinetics: The Assessment of Systemic Exposure in Toxicity Studies; Recommended for adoption at Step 4 of the ICH process on 27 October 1994 by the ICH Steering Committee.
- Igarashi, T. (1994). The use and abuse of toxicokinetics: What does actual data tell researcher? Drug Information Journal, 28, 285-293.
- Igarashi, T. (1995). The rationale for using logarithmic transformation of concentration data in toxicokinetic studies. Journal of Toxicological Sciences, 20, 67-72.
- Igarashi, T. and Sekido, T. (1996): Case studies for statistical analysis of toxicokinetic data. Regulatory Toxicology and Pharmacology (in press).

# GLP下でのトキシコキネティクスの運用と分析法バリデーシ ョンの問題点

杠 輝昭	エーザイ	薬事監査部
相澤 一雅	明治製菓	薬物動態研究所
岡田 惇也	武田薬品	分析代謝研究所

## 1. はじめに

ICHにおいて、Toxicokinetics (TK) をGLP下で実施することが合意され、調印された。こうした中で、日本製薬工業協会 (JPMA) の基礎研究部会第4分科会では、TKで得られる生体試料中薬物濃度測定データの信頼性保証に関し、“GLP適応と分析法バリデーション”について検討してきた。そこで、本サテライトシンポジウムでは、GLP下でTKを実施する際の運用例とTKの実施手順を紹介し、次いで、TK測定（血漿、血清、組織及び尿糞等の生体試料中の薬物濃度の測定）における分析法バリデーションの問題点とその対応策について紹介する。

## 2. GLP下でのトキシコキネティクス実施上の運用について

日本の多くの企業において、TK測定は、安全性試験実施部門ではなく薬物動態試験実施部門あるいは分析試験実施部門（総称して「TK測定実施部門」と略）が担当する場合が多い。そのような組織形態において、TK測定を実施する際の運用の仕方を紹介する（図1）。TK測定の計画書は、安全性試験における試験計画書と区別するためTK測定計画書とし、報告書は、安全性試験における最終報告書と区別するためTK測定報告書とした。同様に、TK測定実施上の責任者は、安全性試験における試験責任書と区別するために、TK測定責任者とした。こうした中で、安全性試験における検査項目のひとつであるTKは、最初に、TK測定実施部門が安全性試験実施部門の試験責任者と協議の上、TK測定の計画書を作成し、その後、生体試料中の薬物の濃度を測定し、測定の結果を報告書にまとめ、その結果を安全性試験の最終報告書に反映させるという仕組みで実施する。

## 3. トキシコキネティクスの実施手順について

GLP下でのTK測定の手順と分析法のバリデーションとの関係について紹介する（図2）。最初に、薬物の分析法を検討し、決定する必要がある。その際には、それまでに得られた薬物動態試験のデータも必要である。次いで、分析法のバリデーションを行う必要がある。バリデーションの目的は、生体試料中の薬物の定量に適した分析法であることを保証し、測定結果（データ）の信頼性を保証することである。バリデーションのパラメータとしては、真度（カタヨリ）、精度（バラツキ）、特異性、定量限界、生体試料中からの薬物の回収率、直線性、測定可能濃度範囲等があり、これらのパラメータに問題がないかどうかを確かめる。バリデーション後、TK測定を実施するための定量法のSOPを作成し、TK測定の計画書と共にQAUによる確認を受ける。次いで、試験ごとの定量法のSOPに従って生体試料中の薬物濃度を測定し、測定結果をまとめる。結果はドラフトの段階で、安全性試験の結果との関連性を安全性試験実施部門と共に協議し、協議した結果を考察の中に入れTK測定報告書を作成し、その後、TK測定報告書は、QA査察を受け、データの信頼性を保証するという手順である。

#### 4. 分析法バリデーションの問題点と対応策の検討

TK測定を円滑に実施するためには、TK測定の実施の際に問題となる点をあらかじめ想定し、分析法のバリデーション、例えば、特異性に対する妨害物質の影響の確認、検量線、回収率の確認、同時再現性、日差再現性、定量限界、生体試料中での安定性等の進め方を検討しておくことが重要と考えられる。そこで、TK測定実施に際しての問題点を抽出し、その対応策をQ&A形式でまとめ、問題解決に当たった。例えば、問題点として、

- 1) 分析法は、開発の進行に伴って改善、改良されていくケースが多いことから、開発の各ステージで分析法のグレードに差異が生じる可能性がある。このような場合、各ステージで用いられる分析法のバリデーションはどの程度実施すればよいと考えられるか。
- 2) 分析法が以下の点で変更される場合、再バリデーションはどの程度必要か。a) 測定機器が変わる、b) カラムのロットが変わる、c) 試薬の購入先が変わる、d) 測定者が変わる、e) 測定施設が変わる、f) HPLCのタイムプログラムが変わる、g) 機器の分析条件が変わる、h) 検量線の処理（解析）方法が変わる、i) 前処理方法の一部が変わる、j) 検量線の濃度範囲を越えたため希釈して測定する、k) サンプル量（例えば、血漿1mlから2ml等）を増やす、l) 動物の種、系統、性が変わる、m) サンプルの種類（例えば、血漿から尿等）が変わる場合。
- 3) 分析する生体試料の量がバリデーションの時に用いた量と異なる場合（予定していた採血量に達しなかった等）。
- 4) 測定値が検量線の範囲を上回り、しかも再測定用の生体試料がない場合、検量線の濃度範囲の上を外挿して、濃度換算してよいか等々である。

Q&A形式で約60項目あるが、これらを全て紹介することはできないので、本シンポジウムにおいては、上記の問題点に対する対応策の一部を紹介する。

#### 5. まとめ

TK測定データのデータは、毒性試験の実施条件の妥当性が明確にされ、毒性所見の解釈に役立つと共に、臨床における安全性との関連についての説明に有用と考えられる。したがって、安全性試験の中でTK測定を円滑に進めるために、「TK測定実施部門」は、各被験物質ごとあるいは各生体試料ごと等の文書化された定量法（SOP等）を効率的に作成することが最大の関心事であるが、TK測定データを科学的に信頼性の高いデータとするためには、さらに多大な時間と労力を要する。したがって、運用面においては、各企業で適切な業務形態と適切なSOPを定めてTK測定を効率よく実施し、データの質保証に注力することが大切と考えられる。TKのGLP適用及び注意深い分析法のバリデーションは、言うは易しく実施は難しいかも知れないが、毒性試験のデータが国際的に受理されるためのTKに関わる努力は、今後とも継続的になされねばならない。

TKのGLP適用及び注意深い分析法のバリデーションは、言うは易しく実施は難しいかも知れないが、毒性試験のデータが国際的に受理されるためのTKに関わる努力は、今後とも継続的になされねばならない。

図1 TK測定に関わる組織形態

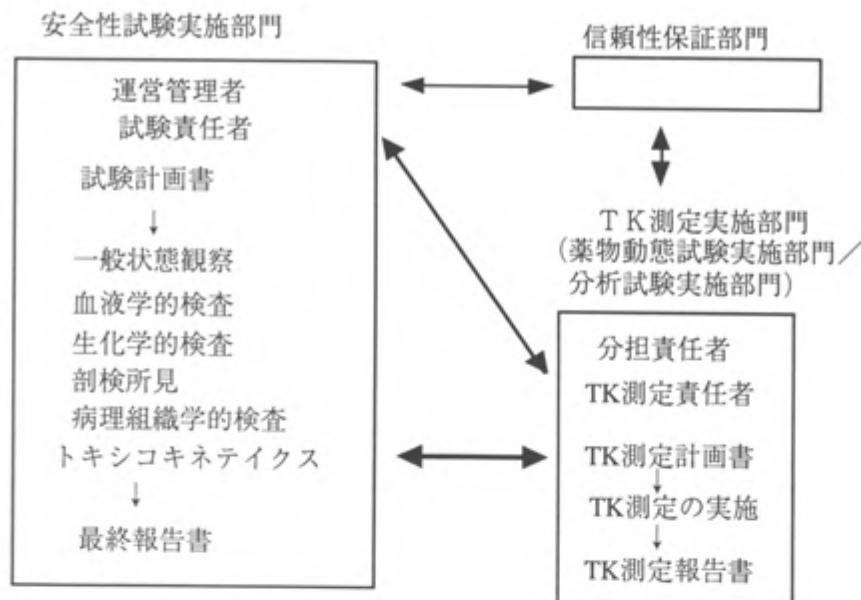
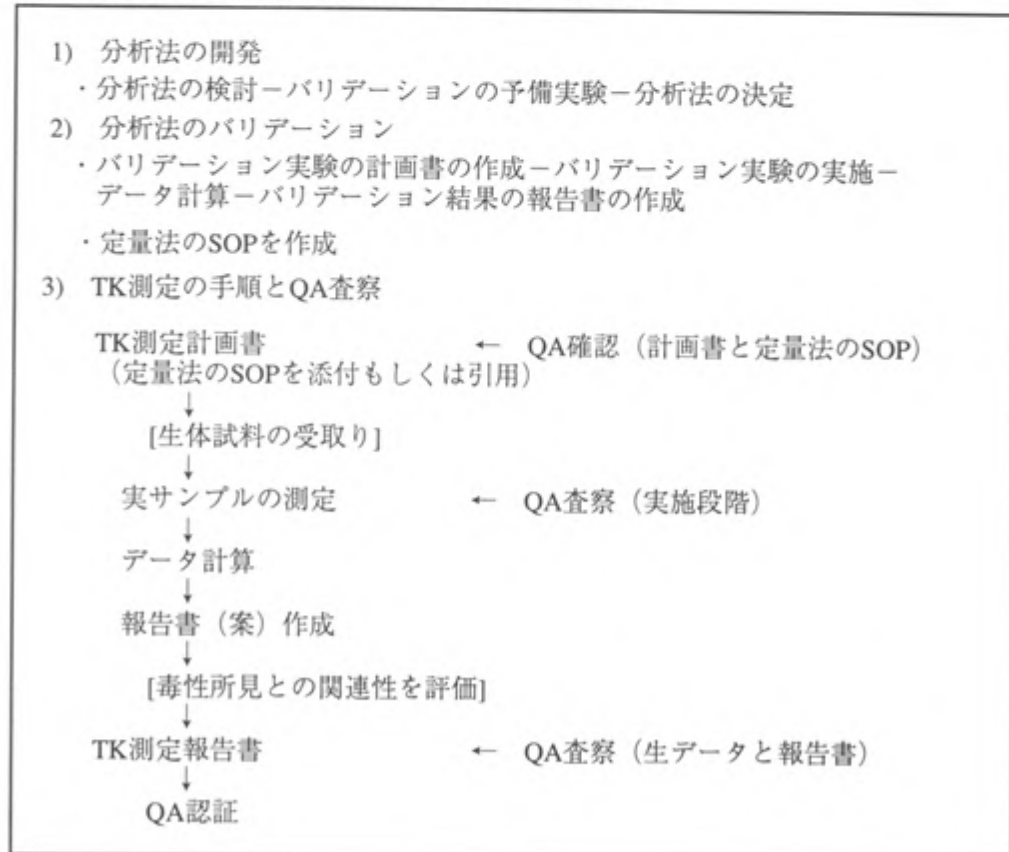


図2 TK測定の手順と分析法のバリデーション



## TKへの期待とその展望：ヒト副作用の予測を目指したTK

杉山 雄一 東京大学 薬学部  
津田 充宥 国立衛試 薬理部  
堀井 郁夫 日本ロシユ研究所 毒性病理部

### はじめに

近年、毒性試験を実施する上で、Toxicokinetics(TK)は必要不可欠なものとなってきている。また、ICHにおいて、「毒性試験における全身的暴露の評価に関するガイダンス」が示され、柔軟で段階的な取り組み方とcase by caseな対応が必要であることが確認されている。TK試験の最終目標がヒトにおける副作用の回避にあることを考えると、実験動物において得られるTK試験データを基にヒト副作用発現の予測に活かす方法論の確立が重要となる。本発表では、ヒトでの予測確率を上げていくためには、どのような情報、解析が必要であるかについて述べたいと思う。

### 副作用がどのようなTK parameterに反映されるか？

薬物のタイプにより、毒作用の発現が、AUCに依存する場合、Cmaxに依存する場合、滞留時間(MRT)に依存する場合があります。しかしながら、現在のところこのような違いに注意が払われた研究がほとんどなく、今後の重要な課題であろう。このような整理がなされる時に、その薬物の薬効発現機序とともに、薬効がAUC, Cmax, MRTのどれに依存するかも併せて解析されることが望ましい<sup>1)</sup>。そのことにより、将来、TK試験において重要なパラメータが、薬効機序別に推測できるようになるかもしれない。そのためには、産、官、学が協力し、副作用の発現(ヒトを含む)と種々のTKパラメータの関係に関するデータバンクの充実を促進することが是非とも必要であることを強調しておきたい。以下、抗癌剤の場合を例にあげて解説する。

抗癌剤の殺細胞作用に関して、ヒト癌培養細胞系を用いたin vitro実験により、殺細胞キネティクス(ファーマコダイナミックス特性)が大きく2つに分類されることが示された。一つは、AUC依存性の作用を示すType I型であり、抗癌性抗生物質・アルキル化剤・白金誘導体・トポイソメラーゼII阻害剤の多くが含まれる。もう一方は、代謝拮抗剤・ビンカアルカロイドに代表されるType II型であり、時間依存性の作用を示す。毒性についても同様な分類が可能であれば、毒性試験の評価においてもAUCのみならず、ヒトと実験動物における薬物の血中滞留時間の差などが考慮されねばならないであろう。抗癌剤の毒性の種類・発現組織は多様だが、中でも骨髄・消化管などの癌細胞同様、増殖性の盛んな組織に多くみられる。文献情報を整理することにより、担癌マウスのLD10を示す総投与量が投与スケジュールによらず一定である化合物と、投与間隔が短い投与方法で小さくなる化合物に分類できることが示された<sup>2,3)</sup>。詳細は省略するが、この分類は、上記のファーマコダイナミックスの分類とほぼ一致し、時間依存性のType II型抗癌剤においてAUCなどによる暴露量のみから臨床の安全性を評価することの危険性を示唆している<sup>2,3)</sup>。実際、殺細胞作用でType I型に属する抗癌剤においてのみ、マウスのLD10におけるAUCとヒトの最大耐用量(MTD)におけるAUCが等しくなることが確認されている(図1)。

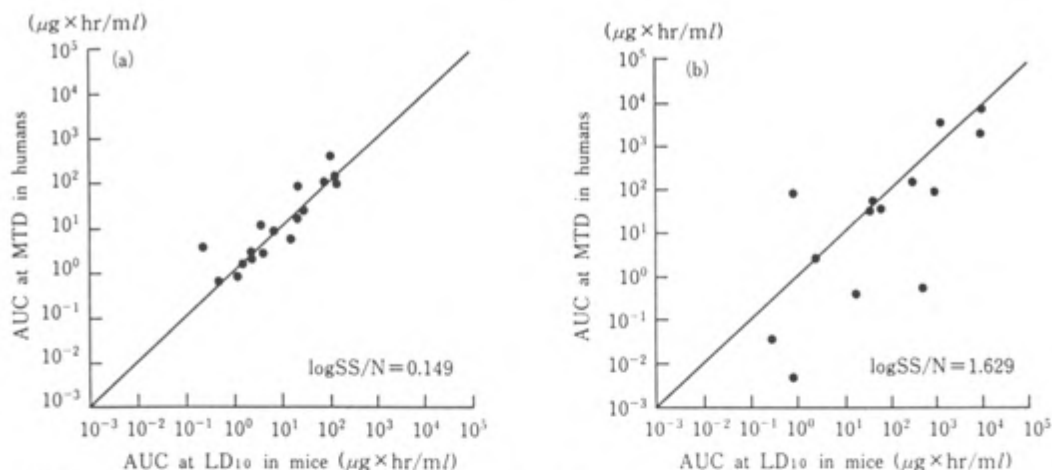


図1 Type 1 (a)および Type 2 (b) 抗癌剤のヒト MTD での AUC 対マウス LD<sub>10</sub> での AUC<sup>2-4)</sup>

Type 1 (ヒト AUC の対数) = 0.886 × (マウス AUC の対数) + 0.216 ( $r=0.898$ ,  $n=18$ )

Type 2 (ヒト AUC の対数) = 0.788 × (マウス AUC の対数) - 0.080 ( $r=0.677$ ,  $n=14$ )

logSS/N はヒトおよびマウスの各対数値の差の二乗和を薬物数で割ることにより算出し、ヒトとマウスの値の違いの程度を表している。

Type 1 では相関係数・傾きとも 1 に近く、ヒトとマウスの値の差 (logSS/N) も Type 2 に比べ小さい。

Type 2 ではヒト AUC とマウス AUC の間に良好な相関は認められない。

このような解析から、ある開発中の薬物の毒性が AUC 依存的に発現されることがわかったならば、実験動物における TK 情報からヒトにおいて副作用が生じる可能性のある AUC が推定されることになる。従って、ヒト組織を用いた *in vitro* での代謝データ<sup>4-6)</sup>、腎クリアランスのアニマルスケールアップ法<sup>4-6)</sup> による予測などと組み合わせることにより、ヒトにおける臨床投与量の予測、安全係数などの予測も可能となろう。

### 採血のポイント

これまでのアニマルスケールアップ法に関する多くの研究により、体重の大きくなるほど体重あたりの全身クリアランスが小さくなることが示されてきた<sup>4-6)</sup>。体重あたりの分布容積にはそれほど大きな種差のないことを考えると、各動物が薬物消失能力という点で、体重に応じた "equivalent time" を持つと考えるとわかりやすい。多くの薬物において、下のアロメトリック式におけるべき乗値が 0.25 近辺であることから、表 1 には、各種実験動物種の equivalent time を示した。このことは、TK の実験プランを作る時に、動物種によって採血時間を変えることの必要性を示している。すなわち、ヒトで投与後 5 分-5 時間までの採血をして解析することに対応する、犬での時間は 2.6 分-2.6 時間であり、マウスでは 0.65 分-0.65 時間である。従って、すべての動物種で採血時間をそろえて解析することは意味がないし、誤った結論を与えることになるので注意すべきである。

$$\begin{aligned} \text{半減期} &= 0.693 \text{ Vdb} / \text{CLtot} \\ &= 0.693 \text{ A(体重)} / \text{B(体重)} \cdot 0.75 = 0.693 \text{ C(体重)} \cdot 0.25 \end{aligned}$$

表1 各実験動物種のpharmacokineticsにおける equivalent times

動物種	平均体重(g)	体重	Equivalent Time (min)
Mouse	22	2.16	0.13
Rat	160	3.56	0.22
Monkey	4,000	7.95	0.49
Dog	5,000	8.42	0.52
Humans	70,000	16.3	1.00

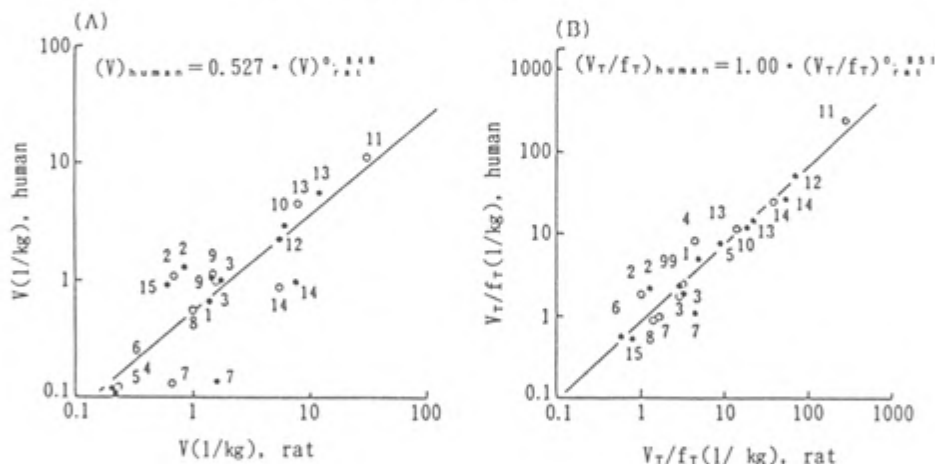
図2：種々の薬物のラットとヒトの分布容積にみられる相関関係

(文献7より引用)

(A) トータル薬物濃度に対する分布容積 (V)。

(B) 非結合型分率で補正した分布容積 ( $V_T/f_T$ )。

図中の番号：(1)フェニトイン、(2)ヘキソバルビタール、(3)ペントバルビタール、(4)フェニルブタゾン、(5)ワルファリン、(6)トルブタミド、(7)バルプロ酸、(8)フェノバルビタール、(9)アモバルビタール、(10)キニジン、(11)クロルプロマジン、(12)プロプラノロール、(13)ペンタゾシン、(14)アゼパム、(15)アンチピリン。



### 血中濃度測定だけで充分であろうか？

1) 血中フリー薬物濃度の測定の必要性： これまで、PK/PDの研究領域では血中蛋白と結合していない遊離型（フリー）薬物濃度の測定の必要性を示す多くの事例が蓄積してきている。蛋白結合性に、種差、個体差の大きいことを考えると、蛋白結合性の大きい（80-90%以上の結合性を示す）薬物においては、このことは特に重要となる。

### 2) 副作用のターゲットが消化管、肝臓にある場合：

上記のように、血中濃度を基準にしたAUC, Cmax, MRTがTKのパラメータとして用いられてきた。しかながら、経口投与される薬で消化管、肝臓を初回通過するときその大部分が取り込まれる場合を想定すると、決して血中濃度基準のAUCが消化管、肝臓中濃度基準のAUCの良い指標とはならないことがわかる。効率良い腸肝循環の生じる場合にも同様のことが言える。このよ



うな場合には、動物実験のレベルで、投与ルート、採血部位を変えるなどの実験を組み合わせデータをとることにより、速度論モデルに基づいて、各組織中での濃度プロファイルを予測することが必要となる。

3) 血中一組織への移行に閾門のある場合、能動輸送が関与する場合：血中から組織への分布が比較的速やかに生じ、かつ組織への分布の程度が血中蛋白結合性と組織高分子への比較的の特異的結合により決まってくる場合には、血中結合性の種差を補正してやれば、ヒトでの組織分布性（分布容積に反映される）を動物データから予測することは可能である（図2）<sup>7)</sup>。しかしながら、血液一脳閾門に代表されるように、血中と組織中の分布平衡に時間がかかる場合、あるいは最近多くの化合物で証明されているように、肝、腎、小腸などに存在する能動輸送系により薬物分布が支配される場合には<sup>8)</sup>、血中一臓器の間をつなぐ伝達関数にどの程度の種差が存在するかについて、ほとんど情報がないため、ヒトにおける予測が困難であるという現状である。今後、この点についても、多くの基礎研究が蓄積されることが望まれる。

## 参考文献

- (1) 堀井郁夫：医薬品開発過程におけるトキシコキネティクス の有用性と問題点：薬物動態 10:S174-175 (1995)
- (2) 杉山雄一、稲葉 實：前臨床試験から臨床試験へ(4)；薬理動態の基礎研究，図説臨床「癌」シリーズ、癌化学療法 の進歩—新版—、末舛恵一、西條長宏 編、メジカルビュー社、pp.96-105 (1993)
- (3) E.Fuse, T.Kobayashi, M.Inaba and Y.Sugiyama: Prediction of the maximal tolerated dose (MTD) and therapeutic effect of anticancer drugs in humans: Integration of pharmacokinetics with pharmacodynamics and toxicodynamics. *Cancer Treatment Reviews* 21: 133-157 (1995)
- (4) 杉山雄一、大家 毅：In vitro試験管内でのデータを基にした薬物体内動態の予測 “ファーマコキネティクス研究の方法と技術” —前臨床から臨床第1相へ— 杉山雄一 編、pp.87-108, 日本薬物動態学会 (1993),
- (5) 杉山雄一、花野 学：Pharmacokinetics 医薬品開発要覧:臨床編、伊藤隆太、太田 喜夫、中島 光好、中村 治雄、府川 和永 編 pp.136-180 R & Dプランニング社 (1986)
- (6) T.Iwatsubo, N.Hirota, Y.Ooie, H.Suzuki and Y.Sugiyama: Prediction of in vivo drug disposition from in vitro data based on physiological pharmacokinetics. (review). *Biopharm. & Drug Disposit.* 17: 273-310 (1996)
- (7) Y.Sawada, M.Hanano, Y.Sugiyama and T.Iga: Prediction of the disposition of nine weakly acidic and six weakly basic drugs in humans from pharmacokinetic parameters in rats. *J.Pharmakokin.Biopharm.* 13: 477-492 (1985)
- (8) M.Yamazaki, H.Suzuki and Y.Sugiyama: Recent advances in carrier-mediated hepatic uptake and biliary excretion of xenobiotics (review). *Pharm.Res.* 13: 497-513 (1996)

# ICHガイドライン“反復投与組織分布試験ガイドライン” の概要と問題点

粟津 莊司 東京薬科大学  
大野 泰雄 国立衛生試験所 薬理部  
進藤 英世 三共 総合研究所

1991年1月現行の薬物動態試験ガイドラインが公表されてから短日月ではあるが、環境は大きな変化を示した。第一にはトキシコキネティクスがICHの主要テーマの一つに採択され、それが1994年には国際的合意に達した事である。さらに一方には薬物動態に関連する学問もしくは技術の進歩が上げられる。これらに対応して、試験のあり方の再検討が迫られるのは時代の趨勢であろう。与えられたテーマである反復投与分布試験ガイダンスもICHにおいてトキシコキネティクスのそれと時期を同じくして合意に達したものであるが、その合意に達する経緯は、先ずトキシコキネティクスがあり、その流れの中で本試験も合意に達したと考えられる。

非臨床試験における薬物動態試験ガイドラインがあるのは三極においては日本だけであり、その点では本ガイドラインの作成時および作成後も他の二極から種々の批判があった。その最たるものは「特定臓器への分布もしくは蓄積は毒性発現の指標とはならない」という論拠に基づく、反復投与による分布試験に関するものである。この点については議論のあるところであろうが、結果として得られたものがICHにおいて合意された「PHARMACOKINETICS: GUIDANCE FOR REPEATED DOSE TISSUE DISTRIBUTION STUDIES (反復投与組織分布試験ガイダンス)；以下、ガイダンスと略」である。その骨子は次のとおりである。

単回投与による組織分布試験の必要性は三極とも認めているが、反復投与組織分布試験の必要性についての統一した考えはなかった。このことについてガイダンスでは次のように書かれている。

(以下は原文のまま)

反復投与組織分布試験の必要性については統一した考えはなかった。しかし、その結果が重要な情報を与えるような状況があり得ると思われる。この文書は、反復投与組織分布試験を考慮すべき状況と、そのような試験の実施についての指針を提供するものである。

## 反復投与組織分布試験を考慮すべき状況

1. 単回投与分布試験により、臓器あるいは組織中の被験化合物（または代謝物、あるいは両者）の見かけの半減期が、血漿中濃度の消失相の見かけの半減期より明らかに長く、且つ毒性試験の投与間隔の2倍より大きいことが示唆された場合には、反復投与試験の実施が適当と思われる。

2. 反復投与薬物動態試験あるいはトキシコキネティクス試験において、体循環中の化合物／代謝物の定常状態レベルが単回投与の動態試験から予測された値よりも著しく高い場合には反復投与組織分布試験を考慮すべきだろう。

3. 被験物質の安全性評価に重要と思われるような病理・形態的变化が観察さ

れ、それらが短期の毒性試験、単回投与組織分布試験、及び薬理試験からは予測されない場合には、これらの結果の解釈に反復投与組織分布試験が助けになるであろう。この場合には病変の発現部位である臓器あるいは組織が試験の主対象となるべきであろう。

4. 標的指向型薬剤を開発する場合には、反復投与組織分布試験の実施が適当と思われる。

(以上、原文終わり)

タイトルから分かるように、反復投与試験が必須とされているわけではない。要約の部には「他の試験からは適切なデータが得られない場合にのみ実施されるべきである」と明記されており、他の試験、例えば、毒性試験動物による測定などの工夫が可能と思われる。ともすればガイドラインはminimum requirementを意味するものに解される傾向がある。注意すべき点であろう。

実施を考慮すべきなのは、披験物質が著しく臓器中もしくは血漿中に留まる場合である。この場合の著しくとは、臓器については臓器中の半減期>血漿中半減期 でしかも蓄積係数>3.5 の場合である。またいわゆるDDS薬剤の場合にもこの実施が期待されているが、薬の目的から考えて当然のことであろう。さらにこの試験の計画と実施に関しては次のとおりである。

(以下は原文のまま)

#### 反復投与組織分布試験の計画と実施

これらの試験の目的は、放射性同位元素標識化合物あるいは十分な感度と特異性を有する他の方法を用いることにより達成されるであろう。

投与量および動物種は、反復投与組織分布試験を行うことになった理由に基づいて選択されなければならない。

反復投与組織分布試験の投与期間は、事前に得られた薬物動態試験ならびにトキシコキネティクス試験から得られる情報に基づいて設定されるべきである。通常は1週間の投与が最低の投与期間と考えられる。当該化合物または代謝物、あるいは両者の血液もしくは血漿中濃度が定常状態に達しない場合には、より長期間投与すべきである。なお、通常は3週間以上投与する必要はないと考えられる。

高濃度の蓄積が起きた場合、あるいは臓器毒性の機作を解明するのに役立つと考えられる時には、臓器や組織中の未変化体または代謝物あるいは両者の測定を考慮すべきである。(以上、原文終わり)

放射性同位元素標識体の使用が規定されているわけではない。十分な感度と特異性を有する他の方法でもよいとされている。しかし現実には標識体を使用されることになると思われるが、この方法でも特異性には問題がある。よりよい定量法の検討は今後も続けるべき課題であろう。また、反復投与試験を行う期間に関する基準も1-3週間とされた。日本での現状もほぼこれと同じであるが、3週間でも定常状態に達しない場合の解釈にはケースバイケースの対応が求められよう。

## 残された問題

### 1 定量的オートラジオグラフィーの活用

合意された反復投与組織分布試験ガイダンスには、分布データの測定法については言及されていない。現行の薬物動態試験ガイドラインにはデータとして「臓器内及び組織内濃度」と「全身オートラジオグラフィーによる体内分布」の二種類が要求されている。前者を得るには通常、摘出部位の測定によるので、これをオートラジオグラフィーのみで済ませようという考えがある。従来のオートラジオグラフィーに比して、高い定量感度と、広い直線性の領域を持つラジオルミノグラフィー (RLG) が、これに応える方法として期待されている。日本薬物動態学会フォーラム委員会の主導により、この方法のvalidationが21の企業の協力を得て行われた(1)。インドメタシンとクラムフェニコールという限られた薬に関するものであるが、臓器を摘出せずにスライス切片を使用してRLGにより各臓器中濃度が定量された。その定量の精度は企業間で約15%(多くは10%)以内の変動係数であった。また摘出法の結果ともよく相関した。今後、この方法が次第に使用されて行くことが考えられる。

### 2 現行ガイドラインとICHにより合意されたガイドラインとの整合性

このことに関連して、現行ガイドラインには見直さなければならない箇所が散見される。しかしこの見直しは、薬物動態学の進歩や、時代の要請を取り入れて検討されるべきであり、本ワークショップでは触れない。

## 反復投与分布試験と毒性との関係

毒性との関連で、現行のような反復投与試験を行う事への批判が行われた。例えば、臓器への分布データが毒性の指標とはなり得ないとの意見は公表されているし(2)、また反復投与試験ガイドライン作成に関して次の様な署名入りの意見が寄せられたほどである。If a drug does accumulate, so what, if there is no unusual toxicity. 確かに分布データがどれほど毒性の先見的指標となり得るかについての公表データは少ない。そこでこれに関するデータが、現在製薬協の基礎研究部会により収集されている。加盟90社中27社より63化合物についての事例につき回答があった。その内35の化合物について分布部位に関連した毒性の発現が認められた。しかしながら、これらの毒性は毒性試験でも観察されており、分布データがその発見に寄与したものはなさそうである。その意味では分布データが先見的指標とはなっていない。

しかしながら「反応は物質を介して起こる」ということがかなりの確率で普遍的に当てはまると考えるならば、薬の候補化合物についての分布データ(反復投与を含む)は基本的データとなるはずである。実際には、ヒトで予期せぬ毒性発現を見た例は多い。定量感度と特異性に支えられた分布データと代謝の種差に関するデータは、これらの危険性を軽減することに資すると考えられるが、これは今後の研究課題として残されるべきものであろう。

## 参考文献

- 1) 薬物動態 9, 351-353(1994).
- 2) A.M.Monro. Drug Metab. Dispos. 22, 341-342(1994)

## 単回投与組織分布試験から反復投与時の蓄積性の予測が可能か

溝尻 顯爾 塩野義製薬 新薬研究所  
進藤 英世 三共 総合研究所  
大野 泰雄 国立衛生試験所 薬理部

ICH-2において反復投与組織分布試験がトピックとしてとりあげられ、1994年ガイダンスが採択された。ガイダンスでは、反復投与組織分布試験を考慮すべき状況として4要件があげられ、その1件目として、「単回投与分布試験により臓器あるいは組織中の被験化合物（または代謝物、あるいは両者）の見掛けの半減期が血漿中濃度の消失相の見掛けの半減期より明らかに長く、且つ毒性試験の投与間隔の2倍より大きいことが示唆された場合には、反復投与試験の実施が適当と思われる」旨の条件があげられている。

今回は、日本でこれまでに行われてきた反復投与組織分布試験で、このような状況が当てはまる頻度はどの程度であったか、及び、その場合単回投与試験から反復投与における蓄積性を予測出来たかどうかを検証する目的で、公表文献を基に検討した。

### 1. 日本における反復投与組織分布試験

反復投与組織分布試験は、日本では主として体放射性同位元素標識 ( $^{14}\text{C}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{125}\text{I}$  など) を用いて、ほとんど全ての開発品について実施されているが、欧米ではそのような試験は実施されないことから、日本特有の試験項目として、ICHでその必要性が論議された。

そこで、はじめに日本での反復投与試験の実施数、かつそれらの試験でみられる蓄積性の発現頻度を調べるため、製薬協医薬品評価委基礎研第4分科会において公表論文の調査を行った。調査概略を表1に示す。

表1 関連雑誌に公表された日本の反復投与組織分布試験数

検索誌	検索期間	対象文献数	高組織移行が報告された文献	
			顕著	やや顕著
薬物動態	1986~1993	55	4	16
応用薬理	1981~1992	13	4	5
基礎と臨床	1981~1992	16	6	5
医薬品研究	1980~1993	43	10	1
薬理と治療	1980~1993	61	5	3
Arzneimittel Forschung	1980~1993	9	3	2

これは上記6誌に公表された試験だけであり、他の雑誌に掲載されたものや、

これは上記6誌に公表された試験だけであり、他の雑誌に掲載されたものや、未公表の試験を加えると、日本で実施されている反復投与組織分布の試験数はかなりの数にのぼるものと思われる。この公表6誌の論文でみるかぎり、197の論文で組織中に蓄積性ありと報告された割合は、 $64/195 \times 100 = 32.5\%$ である。また、単回投与の結果から反復投与後の蓄積性を推測することは困難であったと推定されている場合が多い。

つぎに、上表の薬物動態誌に掲載されたうちの $^3\text{H}$ 及び $^{14}\text{C}$ 標識の51化合物について詳細な検討を行った。

この51化合物について著者自身が組織蓄積性あるいは残留性を認める、と言及しているのは20例である。蓄積性の判定基準は各自で異なるので、ここでは共通の指標として、

$$\text{Accumulation ratio (蓄積率)} = \frac{\text{反復投与24時間の濃度 (実測値)}}{\text{単回投与24時間の濃度 (実測値)}} \quad \dots \quad (1)$$

により蓄積性を判定した。蓄積率が3以上を蓄積性を示す目安とすると、30化合物中の350以上の組織で蓄積性を示すことが分かった。これらを組織別に表すと図1のようになる。ここでは蓄積率を3~5、5~7、7以上に分けて表示した。

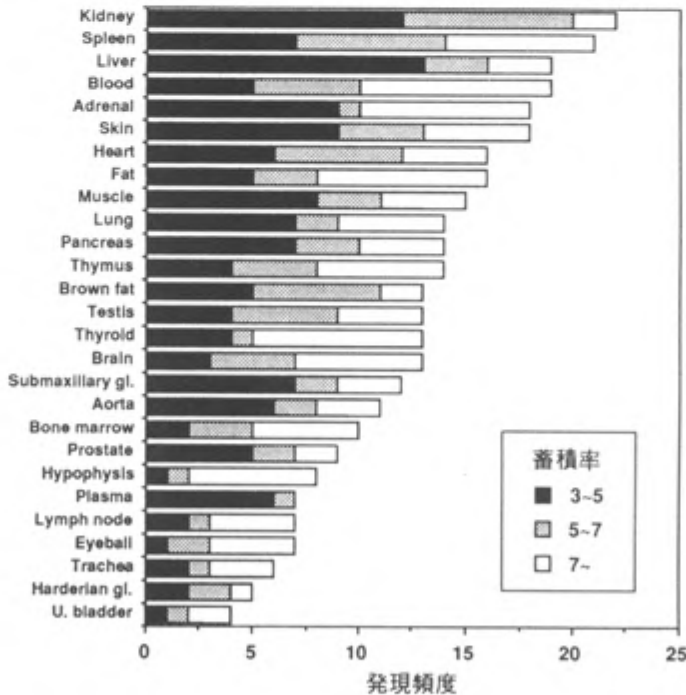


図1.  $^3\text{H}$ あるいは $^{14}\text{C}$ -標識化合物の反復投与組織分布試験における蓄積性の発現頻度 (51化合物より検索)

3以上を示す組織は、腎臓、脾臓、血液、肝臓、副腎、甲状腺等が多く、7以上を示す組織は血液、脂肪、副腎、甲状腺等が多かった。すなわちこれらの臓器・組織では蓄積が起りやすいことがうかがわれた。

## 2. 反復投与組織濃度の予測

単回経口投与後の組織濃度を、薬物速度論的に複数の指数関数で表すと、(2)式で示され、図2のような推移となる。

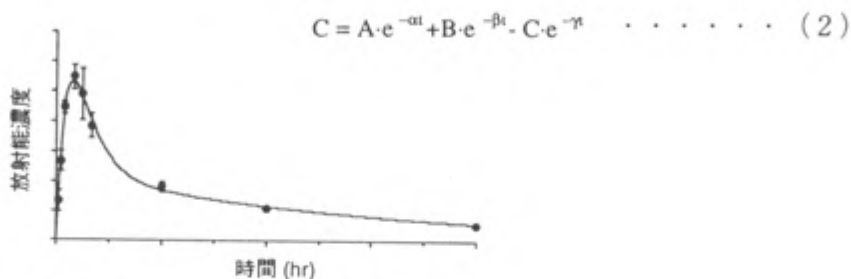


図2. 単回投与時の組織濃度

このときの濃度を基に、(2)式へのあてはめ計算により各キネティックパラメータを求め、さらにこのパラメータを基に反復投与時の濃度推移をシミュレートすると図3のような濃度推移が予測される。

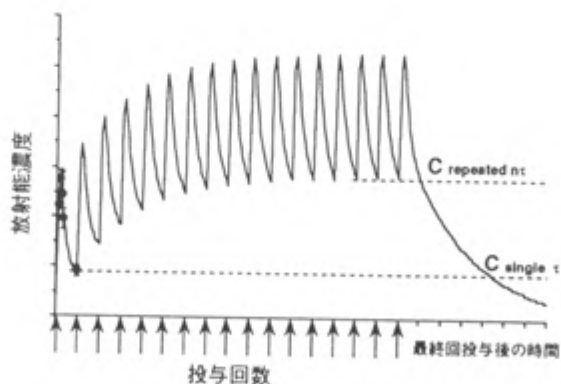


図3. 反復投与時の組織濃度

図3に示した予測によると、11~12回目の投与で組織濃度は定常濃度に達している。このときの最終回投与後24時間の予測値と、単回投与後24時間の予測値の比をaccumulation factor(蓄積係数)と定義する。

$$\begin{aligned} \text{Accumulation factor (蓄積係数)} &= \frac{A \cdot \frac{1}{1-e^{-\alpha t}} \cdot e^{-\alpha t} + B \cdot \frac{1}{1-e^{-\beta t}} \cdot e^{-\beta t} + C \cdot \frac{1}{1-e^{-\gamma t}} \cdot e^{-\gamma t}}{A \cdot e^{-\alpha t} + B \cdot e^{-\beta t} + C \cdot e^{-\gamma t}} \\ &= \frac{C \text{ repeated } nt}{C \text{ single } \tau} \end{aligned} \quad (3)$$

吸収相や $\alpha$ 相の消失が次の投与までに十分終了している場合は、(3)式は(4)式のように単純化される。これが通常accumulation factorとして取り扱われている。しかし、今回は上記条件に適合しない化合物についても予測可能な(3)式を用いた。なお、蓄積係数が3の場合の組織濃度の消失半減期を(4)式を用いて算出すると41時間となる。

$$\text{Accumulation ratio} = \frac{1}{1-e^{-\beta \tau}} \quad \dots \dots \dots (4)$$

### 3. 反復投与組織濃度の蓄積係数(予測値)と蓄積率(実測値)

(3)式にしたがって、単回投与後の組織濃度から反復投与後の組織濃度を予測して、蓄積係数を算出し、蓄積率と比較した。蓄積係数は単回投与時の組織濃度に基づく反復投与後の組織濃度の予測値であり、蓄積率は実測値である。今回の予測は、(1)式を用いたあてはめ計算が可能であった73箇の組織について行った。このうち蓄積率が3以上を示す組織の、蓄積係数と蓄積率の相関性を図4に示した。

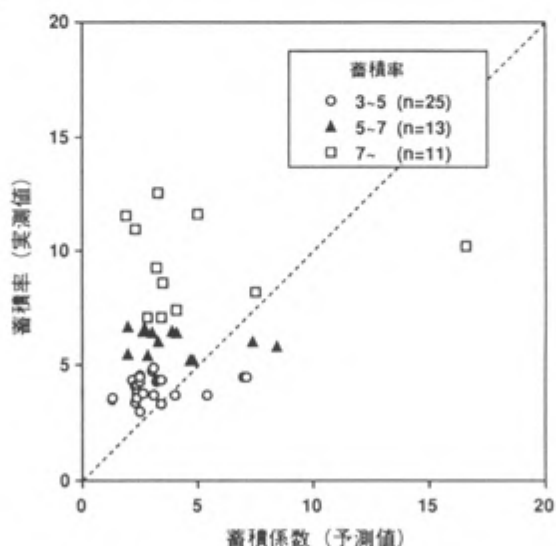


図4. 蓄積係数と蓄積率の相関性

この結果、蓄積率3以上の組織では大部分が蓄積係数より実測値のほうが大きな値となり、また、蓄積率の値が大きいほど蓄積係数からの隔たりも大きいことが認められた。



つぎに蓄積係数と蓄積率の比較の実例を図5, 図6示す. 図5は化合物Aの脂肪組織の例である. この場合は蓄積率と蓄積係数が比較的良好一致している.

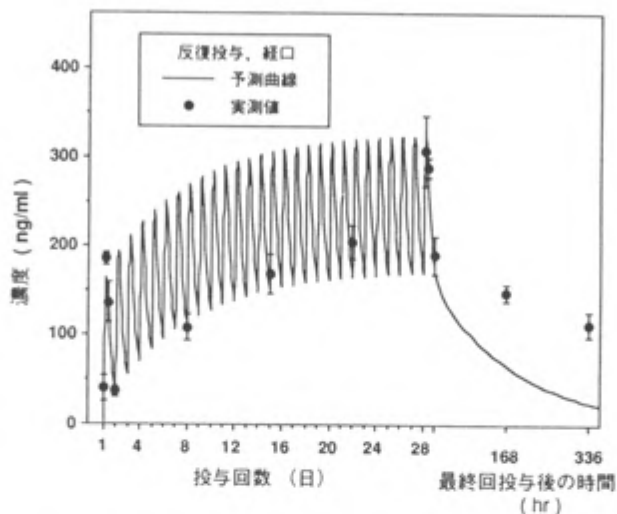


図5. 化合物Aの反復投与後の脂肪組織濃度

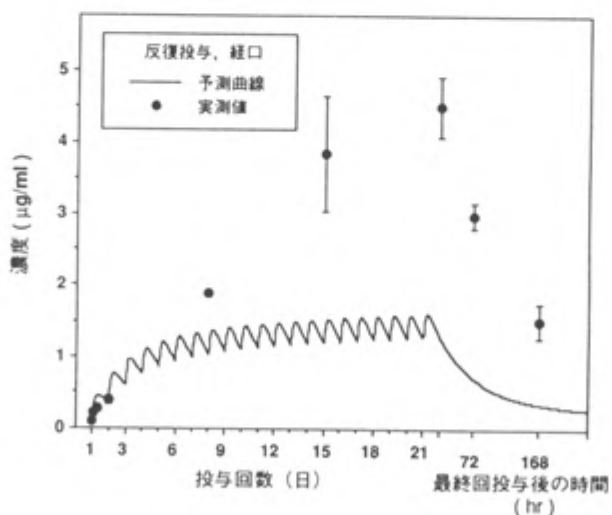


図6. 化合物Bの反復投与後の顎下腺の濃度

しかし, 反復投与後の消失は予測よりかなり遅くなっている. 図6は化合物Bの顎下腺の場合であるが蓄積率と蓄積係数が極めて大きくずれており, 反復投与により予測しえない蓄積が起こりうる事例である.

表2.  $^{14}\text{C}$ -標識化合物をラットに単回投与及び反復投与後の組織蓄積パラメータ

	蓄積率 (実測値)			
	1~3 (n=24)	3~5 (n=25)	5~7 (n=13)	7~ (n=11)
単回投与時の 組織濃度 $t_{1/2\beta}$ (hr)	50.2±35.7	65.3±63.2	79.0±41.8	100.6±114.3
蓄積係数 (予測値)	2.0±0.6	3.1±1.4	4.0±2.0	4.9±4.2
蓄積率 (実測値)	1.9±0.4	4.0±0.5	6.0±0.5	9.5±2.0
組織/血漿濃度比の反復 投与と単回投与時の比率	1.3±0.4	2.2±0.8 (n=23)	3.0±1.4	4.2±2.8

表によると、単回投与時の組織濃度の消失半減期 ( $t_{1/2\beta}$ ) は蓄積率の増大と共に延長した。半減期の延長にしたがって蓄積係数も増大しているが、これらの値はいずれも対応する蓄積率より小さな値をとっている。すなわち、半減期が60時間以上の組織では蓄積係数が3以上となり、蓄積を示すことが予測されるが、このときの実際の蓄積率は予測値以上の値となり、蓄積係数が大きくなるにしたがって予測しがたい蓄積を示す頻度が高くなることが示唆された。

蓄積性を評価するパラメータとして組織/血漿濃度比も有用である。表2で、反復投与時の組織/血漿濃度比の単回投与時の比との割合は、 $t_{1/2\beta}$ が延長するにしたがって増大した。すなわち、半減期が60時間以上で、血漿に比べて蓄積比率が高い組織では予測できない蓄積が起こる可能性が示唆された。

以上公表された報告を基に、反復投与組織分布試験における蓄積性の予測について検索を行った。今回検索対象とした報告は標識体についての試験であり、今検索での最も大きな問題点として、蓄積物質の存在形態が特定できていない点があげられる。しかし、投与した化合物に基づく物質が蓄積していることは確かであり、さらに、この蓄積性は単回投与時の組織半減期が長くなるほど予測値を上回り、予測しえない濃度となる可能性があることが明らかとなった。

今回の検索、解析により、蓄積係数が3以上の組織の場合、すなわち半減期が41時間以上の場合には予測値以上の蓄積が起こりうることを示したが、この半減期はガイダンスに記載されている反復投与試験が必要な1番目の状況とほぼ一致するものであり、このような状況を示す化合物では反復投与組織分布試験の考慮が必要であることを示すものである。

## セッション6 バイオ医薬品の安全性試験

司会：井上 達（国立衛試）、牧 栄二（ヤンセン協和）

### バイオ医薬品の安全性試験 検討班

リーダー	井上 達	国立衛生試験所 毒性部
	牧 栄二	ヤンセン協和 前臨床開発部
委員	上西 憲明	東レ 基礎研究所安全性研究室
	上山 義人	東海大学・医・病理、実中研, KAST
	渦巻 浩也	キリンビール 医薬開発研究所
	落合 忍仁	サントリー 医薬開発研究所
	金子 豊蔵	国立衛生試験所 毒性部
	河合 睦文	日本イーライリリー 研究開発部
	高木 篤也	国立衛生試験所 毒性部
	筒井 尚久	三菱化学 安全性研究所
	納屋 聖人	協和発酵 安全性研究所
	堀井 郁夫	日本ロシュ 研究所毒性病理部

## 安全性試験の基本的な考え方と事例紹介

牧 栄二 ヤンセン協和 前臨床開発部

バイオ医薬品の開発は、遺伝子組み換え技術の向上に支えられ、ここ数年の間に飛躍的な進歩を遂げている。しかしながら、バイオ医薬品の安全性評価については、それらのものがヒト由来の蛋白であるという特性から、一般医薬品と同様の試験方法で安全性評価を行うことには問題がある。本邦におけるバイオ医薬品の安全性評価に関するガイドラインは<sup>1)</sup>薬新第243号「組換えDNA技術を応用して製造される医薬品の承認申請に必要な添付資料の作成について」(1984年3月30日通知) および<sup>2)</sup>薬新第10号「細胞培養技術を応用して製造される医薬品の承認申請に必要な添付資料の作成について」(1988年6月6日通知)がある。しかしながら、これら通知に述べられている安全性試験は、一般医薬品の安全性評価の域を出るものではない。その後、早川ら(1991)1)により「バイオテクノロジー応用医薬品の安全性評価のための前臨床試験実施に関する考察」と題して、バイオ医薬品の安全性試験実施に際しての考え方が報告されている。これら通知ならびに報告と関連して、本邦でこれまでに実施されてきたバイオ医薬品の安全性試験の実施状況を、1995年6月ヒューマンサイエンス振興財団を通じて、バイオ医薬品の開発会社を対象にアンケート調査を行った。その結果、多くのバイオ医薬品についてその特異的な性質を考慮することなく、一般医薬品と同様の安全性試験が実施され、評価されているのが実状であった。

バイオ医薬品の安全性評価を論ずる際に、特に留意しなければならない点を cytokine<sup>2)</sup>を例に挙げて示してみると、次のような事項が考えられる。即ち、バイオ医薬品においては一般医薬品と異なりその効力を発揮するために特異的な受容体を必要とする。その受容体依存性選択的作用機序の結果として、バイオ医薬品においては重篤な過敏性反応を誘発する可能性がある。種特異性に起因する問題として、バイオ医薬品に対するヒトと動物の間の異なった分子構造システムにより、相同分子を用いた動物試験においてもその評価に限界が存在する(例: IL-3受容体)。更に、関連したバイオ医薬品の共通サブユニットのクロストークによる好ましくない受容体の発現も認められている(例: IL-3、IL-5およびGM-CSF受容体で各々が共通の $\beta$ 鎖を共有)。それ故、同種蛋白を用いたシミュレーション試験は有効な安全性評価手段ではあるが、上記のような事例においてはヒトに対する安全性評価という点においては適切な情報とはなり得ない。また、バイオ医薬品の安全性評価を複雑にする要因としてプレイオトロピズム(共通受容体の多臓器間分布)が有り、しかもこれが多くのcytokineに認められ、その結果として遠隔組織での予期しない現象の発現をもたらす。更に、cytokineにおいては親和性の異なったサブユニットへのヘテロ結合に基づく用量相関性の不連続性が認められ、これは $\alpha$ サブユニットと $\beta$ サブユニットの発現比に基づくもので、用量設定ならびに前臨床試験の実施の困難さを示唆する。

Cytokineだけでもこのように留意すべき点が多くあり、ましてや今後如何なるバイオ医薬品が開発されるものか予想もつかない現状において、安全性評価を画一的化することは困難であり、意味をなさない可能性が高い。この事例として、下記に現在開発が進められているバイオ医薬品の試験計画書の一例を示す。

**薬剂事例：** ヒトの免疫細胞の細胞表面抗原に対する抗体

- 1) 適用：免疫抑制剤（投与頻度：月1回で最長6か月）
- 2) 試験動物種：チンパンジー（生物学的応答を示す動物）カニクイザル、アカゲザルのような他の霊長類は反応性なし。勿論、げっ歯類にも反応性は見られない。
- 3) 単回投与：単独では実施しない。  
反復投与試験の初回投与時のデータで代用
- 4) 反復投与毒性：投与期間6か月（月1回の間歇投与）  
推定臨床用量の3～10倍量を上限。剖検は実施しない。
- 5) 生殖発生毒性試験：単独では実施しない。反復投与毒性試験でホルモン検査、性周期検査、精子検査を実施、生殖能に及ぼす影響を調べる。
- 6) 抗原性試験、刺激性試験、変異原性試験、がん原性試験：実施しない。

この例からも明らかなように、バイオ医薬品の安全性を検討するためには、先ず、生物学的応答を示す動物を探すことが重要である。次いで、被験物質の特性ならびに臨床適用を考慮し、実施すべき試験を科学的に判断・選択しなければならない。即ち、バイオ医薬品の安全性試験は画一的に決定されるのではなく、case-by-caseで実施されるべきものであると言える<sup>3)</sup>。

**参考文献**

- 1) 早川克夫、高橋道人、田中悟、松本清司、戸部満寿夫：バイオテクノロジー応用医薬品の安全性評価のための前臨床試験実施に関する考察。医薬品研究、22：28 - 40 (1991)
- 2) 井上 達、平林容子：サイトカインとその応用。バイオサイエンスとインダストリー、52：11 - 17 (1994)
- 3) Inoue, T.: Promotion of further safety research on biotechnology products. In: D'Arcy, PF, and Harron DWG.; Proceedings of The Third International Conference on Harmonisation, Yokohama 1995, pp 237-244, W&G Baird Ltd (1996)

## バイオ医薬品におけるPK /TK試験の問題点と事例紹介

河合 睦文 日本イーライリリー 研究開発部

バイオ医薬品の吸収、分布、代謝及び排泄 (ADME) 試験として、すべてのケースに適用できるような一定の方法を設定することは一般に困難であると考えられる。生体組織中のバイオ医薬品の定量は種々の要因によって複雑である。即ち、蛋白という化学構造上の特性のため、一般の合成低分子の薬物の場合とは異なり、分析データの解釈が簡単にいかない場合が多い。また、薬効用量では組織内濃度が低く定量が難しい場合がある。生体組織中のバイオ医薬品の分析方法としては放射性同位元素標識蛋白を用いる方法、イムノアッセイ、バイオアッセイ、クロマトグラフィー等による分離測定法等が考えられるが、いずれの方法を採用すべきか、また、単一あるいは複数の組合せによる方法を採用すべきかについてはケースバイケースで対処しなければならない。

放射性同位元素標識化合物を用いたトレーサー法は、一般化合物の場合によく用いられる方法であるが、特に蛋白の場合、その存在形態を確認しつつ行わないと意味のないデータを得る危険性がある。蛋白の標識物としてはヨードの放射性同位体<sup>125</sup>I。をチロシン残基に負荷して行う方法があるが、この場合、<sup>125</sup>I。が各蛋白分子に均等に付加しているのか、本来蛋白中に存在しないヨードを付加することにより生物活性に変化が生じていないか、また、<sup>125</sup>I。が生体内で他の形態になっていないかが重要な要因になってくる。一方、<sup>3</sup>H、<sup>14</sup>C、<sup>35</sup>Sをアミノ酸骨格中に標識した蛋白を使用する場合、代謝生成された放射性同位元素標識アミノ酸が生体内にて蛋白の生合成に取り込まれる場合があるので問題はより一層複雑になる。

### 問題事例：<sup>125</sup>I。標識成長ホルモンを用いた試験

- ・ in vivo の脱ヨード化が起こり、放射能測定では無機の<sup>125</sup>I。も同時に測定され、得られた試験結果が過大に評価
- ・ <sup>125</sup>I。標識化に際し、<sup>125</sup>I。が各蛋白分子に均一に付加されていないことが判明

バイオ医薬品は、薬効用量では組織内濃度が低く、定量が困難な場合が多いが、イムノアッセイとバイオアッセイは相互に補足し合うため、有用な手段となり得る。イムノアッセイは、抗体がバイオ医薬品に対して高い選択性を持っているため、感度と特異性の面で、生体内の蛋白を定量する際に先ず採用される。イムノアッセイをバイオ医薬品のPK/TKの研究に使用する場合、関与する蛋白の構造変化に対し免疫反応性が著しく変化する場合もあるので、血中濃度データの解釈は慎重に評価しなければならない。バイオアッセイはその物質が持ち合わせている生物活性を基にバイオ医薬品を定量するので、生物活性を有する代謝物 (活性フラグメント) の測定においてもバイオアッセイ法が適用され得る。ただし、

バイオアッセイは、その生物活性を基に蛋白を検出するので、測定に際し生物活

性に影響を及ぼす阻害因子が定量の正確さを失わすことがある。

近年、ヒト型蛋白に対し、一部のアミノ酸を置換した改変型が開発されてきているが、イムノアッセイ及びバイオアッセイいずれも内在性のヒト型と投与された改変型が同等の免疫反応性と生物活性を有しているため、両者を分析上識別できない場合がある。この場合、何らかの内在性生理学的マーカーがあれば測定可能である。その事例としてヒトインスリンB鎖の28位と29位のアミノ酸を相互に入れ換えた改変型インスリンについて示す。体内でプロインスリン（A、B、C鎖よりなる）からインスリン（A、B鎖）とC鎖が等量生産されることから、C鎖をイムノアッセイで測定し、内在性インスリン+改変型インスリンの測定値（インスリンイムノアッセイ）との差を持って、投与された改変型の組織内濃度を求めることができた。

動物やヒトの試験において、間接的ではあるが、薬力学的解析が有益な手法となることもある。薬力学的評価の例としてインスリン投与後の血糖値のモニタリングがあげられる。遺伝子組み替えによる蛋白が酵素の場合は、*in vitro* でその酵素活性を尺度として測定する方法もあり得る。

バイオ医薬品の場合、実施しようとするADME試験の方法は、バイオ医薬品の特性に応じて個別に立案されなければならないと考えられる。

## バイオ医薬品の特殊性とICHの基本的な考え方

高木 篤也 国立衛生試験所 毒性部

バイオ医薬品の毒性試験のアプローチはしばしば容易ではない。なぜなら、バイオ医薬品の場合、その物性が主として蛋白質であることによって異種動物において抗体産生を起こす場合が少なくなく、このことがしばしば長期試験の実施を難しくするからである。一般にバイオ医薬品は、レセプターを介してその作用を発揮するが、この際、1)プレイオトロピズム、2)リダングンシー、3)不連続的用量作用相関等、レセプターを介した作用に特有の現象を起こす傾向にある。これらはいずれも動物試験からヒトへの外挿を困難にする要因であるが、更に対象によっては全くヒトとの交叉性のないものも少なくない。のような理由から、バイオ医薬品の前臨床試験評価のために日本、米国、ヨーロッパとも科学的で柔軟なcase-by-caseの方策を行政基準として採用してきた。しかしながら、このcase-by-caseでの対応を達成するためには、各国間の共通の認識が必要である。そこで、不一致性を最小にし、不必要な試験の実施の可能性を減らすために、ICHのS6(バイオ医薬品の安全性評価)グループはバイオ医薬品の前臨床試験に推奨される毒性試験の基本的枠組みに関するガイダンスの作成に向けて討議を行っており、その内容は昨年秋に横浜でのICH3で報告されたとおりである。

ICH3横浜以降の検討、修正点は1)本資料が飽くまでもバイオ医薬品の安全性評価を実施する際のcase-by-caseの考えを統一するための留意事項的のものであり、本資料の内容がバイオ医薬品の開発のチェックリストにならないようにするために、一部文章を加筆したこと、2)安全性試験実施において他に手段がない場合、同種蛋白質を用いて検討する記述があるが、これについても1)とあいまってその使用は試験実施者の裁量で行われるものである点を明らかにしたこと、3)がん原性試験の項目にトランスジェニック動物の使用の記述があったが、これを削除したことである。

プレゼンテーションにあたっては、以上について、その概要を述べる。



## 新しい安全性評価法への挑戦：

### —トランスジェニック／免疫不全マウス作製の経験—

上山 義人 東海大・医・病理部、実中研、K A S T

新たなバイオ薬品が開発された場合、その効果を判定する目的でリガンド遺伝子を導入した実験動物を開発することが考えられる。さらに、長期投与実験のことを考えると、これらの動物を免疫不全マウスと組み合わせた遺伝子導入／免疫不全動物の開発が必要とされることがあると考えられる。この遺伝子導入／免疫不全動物の開発に際して、免疫不全マウスの受精卵に、直接、遺伝子導入を行うことが出来れば、一段階の操作で目的の動物を得ることが出来るが、遺伝子導入動物を作製し、そのマウスと免疫不全マウスを交配して目的の動物を作製するという方法をとると、その間に必要とされる時間と労力は大変なものになる。

一方、我々はヒトの造血細胞を移植出来るマウスを作製する目的で、ヒトの造血因子遺伝子（hGM-CSF, hIL-3, hSCF）導入／SCIDマウスの作出を試みた。最初は、直接、SCIDマウス受精卵への遺伝子導入を試み、次に、ヘテロ・マウス（SCID/+）の受精卵への遺伝子導入を試みたが、いずれも、受精率が非常に低く、ほとんど産仔が得られず、目的とするマウスを得られなかった。この原因としては、奇形精子が多く、個体差が大きいことなどの要因が考えられたが、いずれにしても、我々の今までの経験から考えると、少なくとも現在の段階では、遺伝子導入／免疫不全マウスの作製は、それほど容易ではないと考えられる。我々は、現在、遺伝子導入マウスを作製した上で、このマウスを免疫不全化する方法で目的とするマウスを得ているが、今後、安全性評価におけるリガンド遺伝子導入／免疫不全マウスの必要性を考えると、SCIDマウス以外の免疫不全マウスの選択や個々の段階における種々の要素を解析して、作製成績を上げていく必要がある。

以上、我々の遺伝子導入／免疫不全マウス作製の具体的な成績を挙げながら、これらのマウスの作製が容易でないことを述べる。

## 閉会の挨拶

司会： 五十嵐俊二（エーザイ）

## まとめ

柳田 知司 前臨床医学研究所