

安全性薬理試験の実際

住友化学工業(株) 生物環境科学研究所

三野 照正
野田 有宏
辻本 伸治
杉本 眞一
中野 実

Current Practices Safety Pharmacological Study

Sumitomo Chemical Co., Ltd.

Environmental Health Science Laboratory
Terumasa MINO
Tomohiro NODA
Shinji TSUJIMOTO
Shin-ichi SUGIMOTO
Minoru NAKANO

Safety pharmacology is one of non-clinical evaluation aimed to assess the safety of medicinal products by examining the pharmacodynamic properties. Recently, ICH guideline for the safety pharmacological study is designed to obtain the information necessary to predict the potential adverse effects and assess the safety of the substance in humans.

In this paper, we explain the circumstance of ICH guideline establishment and its summary, and describe our current practices in evaluating of vital function, chiefly cardiovascular system, are considered to be the most important ones to assess in safety pharmacological studies.

はじめに

安全性薬理試験とは、新規医薬品の安全性を薬理的観点から検討する非臨床試験であり、曝露に関連した被験物質の生理機能に対する潜在的に望ましくない薬力学的作用を検討する試験として定義される。

本項では安全性薬理試験ガイドライン制定の経緯およびその内容について一般薬理試験と対比させながら解説し、さらに安全性薬理評価体制の確立に際しての課題対応と実際の評価体制について循環器系を中心に紹介する。

1. 安全性薬理試験ガイドライン制定の経緯と概要

(1) 経緯

ヒト機能における有害事象を予測することは医薬品の開発上、極めて重要であると考えられ、その方法のひとつに薬理学的手法が日本も含め、欧米諸国で用いられてきた。しかしながら、安全性を評価する薬理試験において、行政当局が発行するガイドラインや指針等はほとんど存在せず、唯一日本の一般薬理試験ガイドライン¹⁾がそれに該当していた。

一般薬理試験ガイドラインは、それまで歯止めなく増加する試験項目を食い止めるために1991年に制

定されたガイドラインであり、試験目的として1)薬理プロフィールを明らかにすること、2)副作用の予測と対策の検討、3)毒性試験では必ずしも明らかにできない機能への検討、の3つが記載された。また、実施に際しては第1表に示す如く通常実施するA項目と必要に応じて実施すべきB項目とに分けられた。しかしながら、その制定の経緯から本試験は薬理プロフィールの把握に主目的が置かれたものであったため、安全性の評価については形骸化したものとして必ずしも十分にフォローされない場合もあった。また、このことは副作用の予測を考えた場合、他の安全性試験に比べると方法の確立あるいは技術の体系化が遅れる要因となった。

一方、医薬品開発における安全性の確保として、副作用の予測等における重要性が増すに伴い、一般薬理試験と称する薬理試験の役割が期待されるに至り、1993年には米国でGeneral pharmacology/Safety pharmacology Discussion Meetingが発足した。さらに、1997年に公布された日米EU医薬品規制調和国際会議(ICH)ガイドライン(臨床試験の実施に必要な非臨床試験の実施のタイミングのガイドライン)²⁾では安全性薬理試験と言う用語が国際的に初めて用いられた。しかしながらこのガイドラインでは、安全性薬

第1表 安全性薬理試験と一般薬理試験の対比表

	安全性薬理試験	一般薬理試験
目的	ヒトの安全性において望ましくない薬理作用の特定と作用機序毒性および臨床試験で認められた有害作用評価	薬理プロフィールの把握 副作用の予測と対策
試験項目	コアバッテリー：中枢神経系(症状観察)、呼吸(呼吸数+その他のパラメータ)、循環器(血圧、心拍数、心電図、心筋伝導系評価) 下線：実施を考慮すべき項目 フォローアップ：上記試験結果よりも深い理解が必要な時に実施 サプリメント：コアバッテリーあるいは反復毒性試験で検討されなかった器官系の機能	A項目： 症状観察、中枢神経(自発運動、麻酔、痛覚、痙攣、体温)、呼吸・循環器(呼吸運動、血圧、心拍数、心電図、血流量)、消化器(腸管輸送)、肝機能(尿量、電解質)、自律神経・平滑筋(摘出回腸) B項目： 中枢神経、呼吸、循環器、消化器、腎機能、平滑筋、体性神経、自律神経、血液など
実施時期	コアバッテリー：臨床試験までに実施 フォローアップ、サプリメント：通常承認まで	記載なし
投与量	用量作用関係を考慮 薬効薬理量あるいは治療用量からみて十分な量 上限設定：ある程度の有害作用を生じる用量	用量作用関係を考慮 薬効薬理作用などを示す量からみて十分な量 上限設定：薬効量の10倍など具体的表示
代謝体 異性体	主代謝体(ヒト)、活性代謝体および最終製剤がラセネ体の場合、個々の異性体も必要に応じて実施。	記載なし
GLP	原則的に要求	記載なし

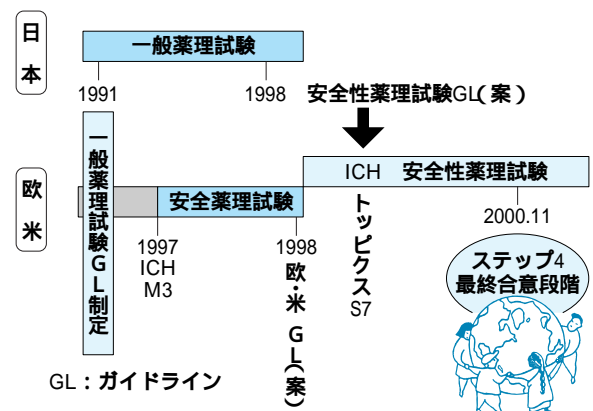
理試験の定義を始め、試験の詳細は将来の検討事項として遺された。これらの情勢から、国内においても「一般薬理試験ガイドライン」を見直す気運が高まり、厚生省は1996年に厚生科学研究班を組織し、その改訂に着手した。その結果、1998年には世界に先駆けて安全性薬理試験ガイドライン案を日本の厚生省は公表したが、その直後に欧州および米国においても当該ガイドライン案が検討中であることが伝えられた。そこで日本製薬工業協会は、安全性薬理試験ガイドラインのハーモナイゼーションが必要であるとして厚生省と協議を行い、本ガイドラインの作成をICHの新トピックスとすることをICH運営委員会において提案した。その後、本案件は1998年9月に承認され、2000年2月にはStep 2(日・米・欧、産、官の一次合意段階)、同年11月にはStep 4(最終合意段階)に達し、現在に至っている(第1図)。

(2) 概要

安全性薬理試験ガイドライン³⁾は序論(目的、背景、適用範囲、一般原則、定義)、ガイドライン[試験目的、一般的配慮、試験方法、実施のタイミング、Good Laboratory Practice(GLP)の適用など]および注(薬力学的試験、副次的薬力学的試験の定義など)の3項目で構成され、内容的には一般薬理試験と類似するところもある。本項では第1表に示した目的、試験項目、投与量、実施のタイミング、代謝物・異性体、GLPの適用について一般薬理試験と比較しながらその特徴について紹介する。

安全性薬理試験の目的は、被験物質の副作用を特定し、前臨床データから予測される有害作用や臨床

第1図 安全性薬理試験ガイドライン制定の経緯



で見られた有害事象を評価、その機序を検討することにより、薬理プロフィールの把握を目的とする一般薬理試験とは考え方において明らかに異なっている。従って、一般薬理試験ガイドラインのように全ての被験物質で実施するA項目、さらに必要に応じて実施するB項目といった試験のリスタップは安全性薬理試験ガイドラインでは最小限に抑えられており、薬理学的特性、化学構造、治療分類、毒性情報などから適切な試験が論理的に決定されるように配慮されている。そしてその重要性から中枢神経系、呼吸・循環器系などの生命維持機能に関する評価についてはコアバッテリー試験として原則的にどの被験物質についても求められ、ヒトでの試験に移行する前に行われる。

投与量については、薬効用量もしくは治療用量以上の用量での用量反応関係について確認する必要があり、基本的には一般薬理試験と考え方に差を認めない。し

かしながら、無影響であることを示す最高用量は同一投与経路および同様な投与期間の毒性試験で何らかの影響を及ぼす用量に設定することが条件となっており、薬効用量、治療用量あるいはLD₅₀ 値(半数致死量)から投与量の上限を算出する一般薬理試験とは異なっている。

その他、試験の実施時期、代謝物・異性体の試験実施の必要性についても、一般薬理試験ガイドラインでは触れられていないが、安全性薬理試験ガイドラインでは明記されている。

今回、安全性薬理試験ガイドラインの制定にあたり最も議論を呼んだのはGLP 適用の是非であり、最終的には生命維持機能に関する情報であることを踏まえて、試験の品質・信頼性を保証するために、安全性薬理試験は原則としてGLP で実施しなければならないとの結論に至った。

以上のことより、国際的に標準化された新しい安全性薬理ガイドラインに沿った評価体制の確立にはGLP 体制の構築、生命維持機能に及ぼす作用評価の充実が最重点課題として考えられた。

2. 安全性薬理試験実施における課題対応

(1) GLP 対応

欧州では1993年EC 委員会の指針91/507/EEC において、副作用の可能性を確認するためにデザインされた薬理実験はGLP 基準を適用すべしとの見解が既に発表されている。この見解に対して反論を唱える国も少なくはなかったが、総じて安全性を評価するための薬理試験はGLP 規制下で実施すべきとの意見が海外では一般的と考えられた。一方、現状のGLP は毒性試験を対象に作成されたものであり、薬理試験のGLP 適用については試験の性質の違いから生じる様々な問題(1 試験の定義、投与液の分析、施設のゾーニング、標準操作手順書作成の困難さなど)が懸念されたが、いずれも安全性薬理試験がGLP を拒む本質的な理由でないと考えられた。加えて生物環境科学研究所は医薬品GLP 試験の実績が豊富な組織であることから、当該施設におけるGLP 対応下での安全性薬理試験の実施は可能と判断し、安全性薬理試験ガイドラインのファイナル化に先駆けて標準操作手順書の作成および機器の整備等の対応を行った(1999年8月~12月)。その後の実績としては化合物2剤の安全性薬理試験をGLP 対応下で実施した。

(2) 生命維持機能評価体制の充実 循環器系

生命維持機能において最も重要な器官は中枢神経系、循環器系および呼吸器系であり、これら諸器官への重度の影響は生体において致命的なダメージを与える。具体的には中枢神経系で痙攣や意識障害など、

循環器系では不整脈や循環ショックなど、呼吸器系では気管支痙攣や呼吸不全などが挙げられる。

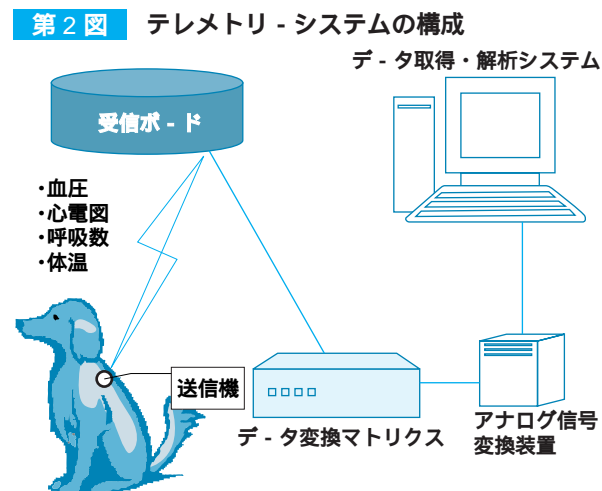
一般薬理試験では被験物質の薬理作用を見極めることに主眼が置かれるため呼吸・循環器系の評価においては安定したパラメータが得られる麻酔動物の使用が一般的である。しかしながら、その一方で麻酔作用により本来あるべき神経系を介する影響が減弱し、加えて麻酔薬の種類やその程度によっては試験結果に齟齬が生じることが知られている^{4,5)}。安全性薬理試験ではヒトでの副作用予測に試験の目的は絞込まれており、そのためにはより生理的な状態、すなわち無麻酔、無拘束下での評価が望ましいと考えられ、それら評価体制の整備が急務となった。加えて近年、非循環器系の薬剤である抗ヒスタミン剤の過量投与や肝機能低下時の副作用として心電図上のQTc 間隔の延長やそれに伴う重篤な心室性不整脈の発現が問題となっており⁶⁻⁸⁾、致死性の不整脈の発現を予測する有用な手段の確立も急務となった。

このような理由から循環器系の新規評価系として、

① テレメトリー自動計測システムによるイヌ循環器系評価、および② モルモット単離心室筋細胞を用いたパッチクランプ法による電気生理学的評価システムの確立に着手した。以下、各システムについて解説する。

① テレメトリー自動計測システムによる循環器系評価

テレメトリー自動計測システムは第2図に示す如く、データ取得・解析システム、データ変換システム(データ変換マトリクス、アナログ信号変換装置)、実験動物テレメトリーシステム(送信機、受信ボード)の3つのシステムで構成される。センサーにより計測された生体信号は送信機内で周波数に変換された後、近傍の受信ボードに送信される。その後、信号はオンラインでデータ変換マトリクスへ送られ、ハイエンドデータ取得・解析システムを用いてリアルタイムに解析・表示される。



本システムの特徴として、無拘束および無麻酔といった生理的な状態で動物の循環器系パラメータを同一個体で繰り返し測定することが可能になったことであり、このことは実験に使用する動物数の減少につながる。さらには実験に伴うストレス、苦痛なども大幅に軽減されたことから動物愛護の面からも有用な手法として考えられる。

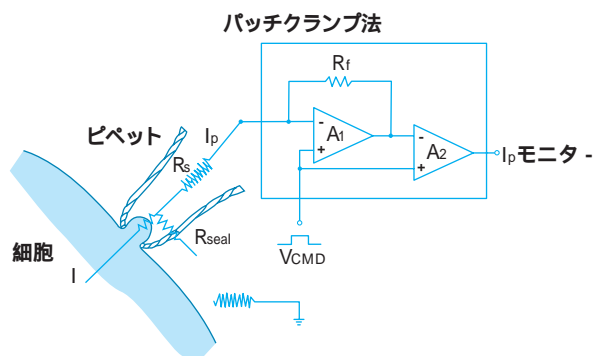
現在、各パラメータの日内および日間変動の検討を終了し、各種陽性対照薬のバックグラウンドデータを集積している。

② モルモット単離心室筋細胞を用いたパッチクランプ法による電気生理学的評価

パッチクランプ法は1976年にNeherとSakmann⁹⁾によって開発され、細胞膜の単一あるいは複数個のイオンチャンネルの活動を、それを通るイオン電流として記録する方法である。

パッチクランプの原理は、細胞膜にガラス微小ピペット(パッチ電極)をギガオーム(10^9)以上の高抵抗で密着(ギガシール)させ、その先端開口部の微小膜領域(パッチ膜)を電気的に他の領域と隔絶した状態で電位固定し、そこに含まれるイオンチャンネルを通るイオン電流を計測するものである(第3図)。

第3図 パッチクランプの原理(出典*:パッチクランプ実験技術法)



R_s (パッチ膜抵抗に直列に入る series resistance)は通常1 - 5M で、 R_{seal} (シール抵抗)が100以上となれば $I_p/I = R_{seal}/(R_s + R_{seal}) \sim 1$ となる。この I_p をI-Vコンバータ(点線)内の高抵抗 feedback resistor(R_f)における電圧降下として検出する。

*パッチクランプ実験技術法、岡田泰伸編、吉岡書店(1996)

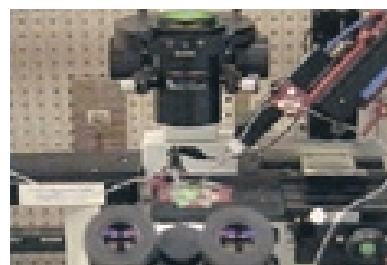
我々は薬物の心臓に対する安全性薬理評価の一環として、モルモットの単離心室筋細胞を用い、パッチクランプ法(whole-cell clamp)により活動電位および電流を評価することとした。心筋の活動電位を評価する *in vitro* 試験系としては、他に乳頭筋標本を用いる微小電極法が知られているが、微小電極法では

正確な電流測定は不可能である。これに対し、パッチクランプ法では活動電位の測定に加え、微小電流の変化を低ノイズでリアルタイムに測定出来ることから、活動電位に影響を及ぼした電流の同定など作用機序の解析が可能となる利点がある。以下にパッチクランプ法による試験の概略を述べる。ランゲンドルフ装置に取り付けた心臓にコラゲナーゼ溶液を大動脈から逆行性に灌流することにより心臓の結合組織を消化し、単一の心室筋細胞を得る(第4図)。次にシールドボックス中に設置した倒立顕微鏡ステージに取り付けたチャンバー内に単離した心室筋細胞を播種し、栄養液を灌流している状態で、3次元電動マニピレーターを操作しながらパッチ電極を細胞膜表面に接触させる(第5図)。直ちにガラス電極内に弱い陰圧をかけギガシールを形成させ、さらに陰圧を加えパッチ膜部分を破ることで *whole-cell clamp* へと移行

第4図 モルモット単離心室筋細胞
コラゲナーゼ処理により単離された細胞



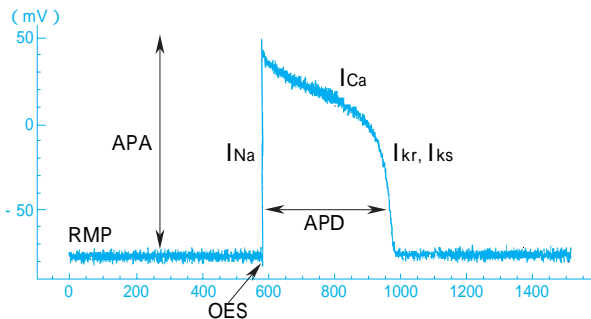
第5図 パッチ膜の形成



マニピレーターを操作し、心室筋細胞にパッチ電極を密着

させる。パッチ電極から得られる電気信号はパッチクランプアンプにより増幅され、ADコンバーターを介してコンピュータに取り込みデータの解析を行う。コンピュータはプログラムソフト上で刺激条件を設定することにより、電気刺激装置としての機能も兼ねており、設定した電気刺激はADコンバーターを介してアンプおよびパッチ電極へと送られ細胞を刺激する。この時、パッチクランプアンプのモードをvoltage clamp modeにすると電流の測定が可能であり、current clamp modeに切り換えると電位(活動電位)の測定が可能となる。薬物はチャンパー内を灌流する栄養液中に添加することにより心室筋細胞に適用する。薬物の評価として、活動電位の場合は静止膜電位(RMP)、活動電位振幅(APA)および活動電位持続時間(APD)に及ぼす影響を、また電流についてはL型Ca電流(I_{Ca})および遅延整流K電流(I_{kr} , I_{ks})に及ぼす影響をそれぞれ評価している(第6図)。現在、これらの試験法のバリデーションはほぼ終了し、バックグラウンドデータを集積している。

第6図 心室筋細胞の活動電位と電流の関係



静止膜電位(RMP)は約 - 80mV であり、刺激により Na^+ コンダクタンスが増大し(I_{Na})、脱分極が生じる(APA)。 Na^+ チャンネルは直ちに閉鎖するが、代わって Ca^{2+} チャンネルが開き Ca^{2+} コンダクタンスの増大(I_{Ca})による脱分極が持続する。その後、 Ca^{2+} チャンネルは閉鎖し、2種類の K^+ チャンネルを通る K^+ イオンが流出する(I_{kr} , I_{ks})ことで再分極が完了する。活動電位持続時間(APD)は脱分極から再分極までの時間を示している。

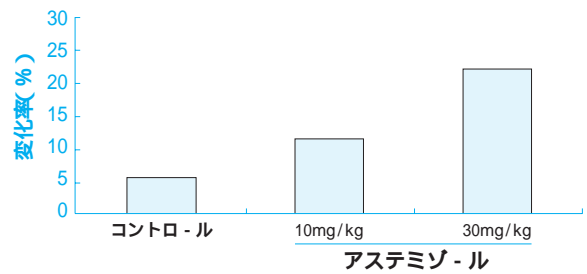
APA : 活動電位振幅 RMP : 静止膜電位
 APD : 活動電位持続時間 I_{Na} : Na 電流 I_{Ca} : L 型 Ca 電流
 I_{kr} , I_{ks} : 遅延整流 K 電流 OES : 電気刺激

③ 不整脈を誘発する非循環器系薬剤の評価

上記2つの実験系を用いた抗ヒスタミン剤の評価結果を紹介する。アステミゾールは第2世代の抗ヒスタミン剤であり、副作用として心電図QTc間隔の延長やそれに伴う致死性の心室性不整脈を過量投与や他剤との併用で誘発する^{10,11)}。

今回確立したテレメトリーシステムの評価において、

第7図 アステミゾールの覚醒イヌ心電図(QTc)に及ぼす影響

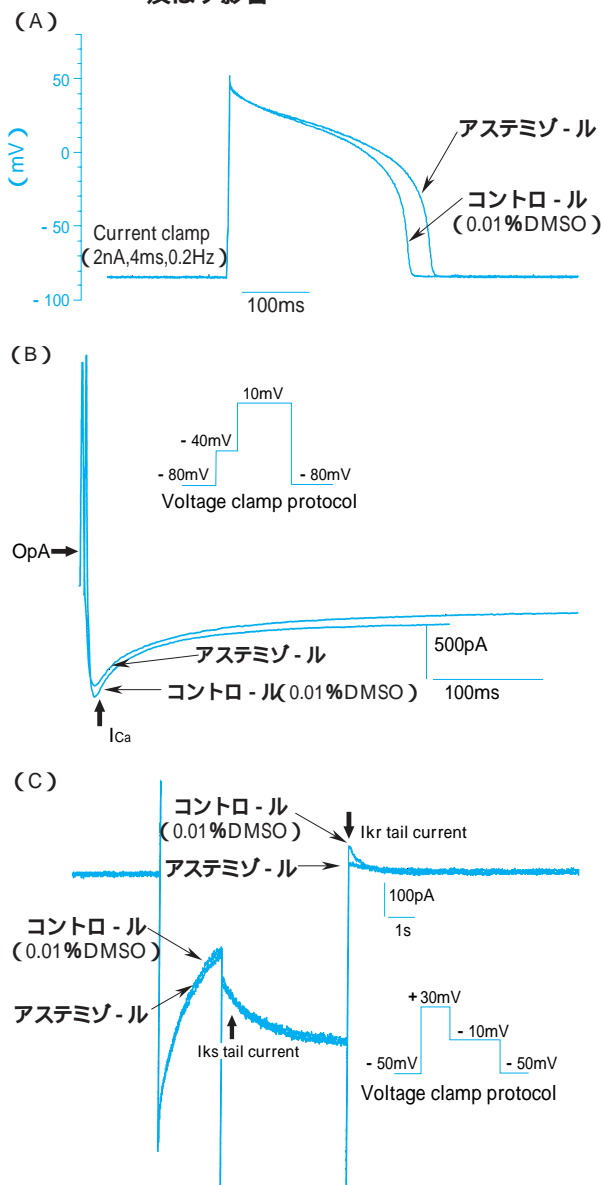


アステミゾールは0.5%メチルセルロース溶液(0.5% MC)に懸濁し、単回経口投与した。コントロール群には0.5% MCを同様に投与した。心電図は第II誘導により導出し、テレメトリーシステムを用いて測定した。棒グラフは2例の平均値を示す。

アステミゾールの10および30mg/kg経口投与は覚醒イヌのQTc間隔を用量依存的に延長した(第7図)。この結果はアステミゾールの投与による心室性不整脈誘発の可能性を示しているが、さらにその予測性を高める手段として単離心室筋細胞を用いた電気生理学的解析が有用である。すなわち、心電図上のQTc間隔は心室筋細胞のAPDを反映しており、APDの遅延はQTc間隔の延長を引き起こすことが知られている。従って、単離心室筋細胞のAPDへの影響を評価することは薬物の心電図への影響を細胞レベルで評価することにつながる。第8図-Aはアステミゾールのモルモット単離心室筋細胞に対する評価結果を示しており、アステミゾールの適用により心室筋細胞のAPDは明らかに延長した。なお、適用濃度である30nMは本剤の*in vitro*における主薬効用量(IC_{50} : 79nM)²⁾よりも少なく、このことはAPDの延長が薬剤の細胞に対する非特異的な影響によるものではないことを示している。また、アステミゾールを投与した患者において、QT間隔延長あるいは心室性不整脈が見られる本剤の血中濃度は65~200nM¹²⁾であり、前述の適用濃度にほぼ符合している。さらに、その作用機序解明として実施した各種イオン電流に対する評価において、アステミゾールは I_{Ca} 電流および I_{ks} 電流にはほとんど影響を与えず、 I_{kr} 電流を完全に抑制した(第8図-B, C)。従って、本剤の催不整脈作用は K^+ チャンネル(I_{kr})の阻害に起因すると考えられ、既に報告されているSalata, JJら¹³⁾の結論と一致している。

以上、致死性の心室性不整脈を誘発する薬剤の安全性評価を今回確立した*in vivo*および*in vitro*の実験系を用いて検討した結果、これらの実験系は薬剤の副作用発現を予測、さらには機序解明を行う上で有用な手法であることが確認できた。

第8図 アステミゾ - ルのモルモット単離心室筋細胞に対する電気生理学的パラメ - タに及ぼす影響



アステミゾ - ルの30nMを適用し、パッチクランプ法により活動電位(A)、L型Ca電流：I_{Ca}(B)および遅延整流K電流：I_{kr}、I_{ks}(C)を測定。図は典型例を示す。

おわりに

安全性薬理試験は2000年の秋にその定義、目的などがICHで定められた新規の研究分野として考えられるが、本試験の目的であるヒトでの有害事象の予測性

については現状必ずしも十分とは言えない。従って、今後の課題としては有効な安全性薬理手法の開発であり、加えて臨床薬理学や毒性学を含めた広義の薬理学に精通する安全性薬理研究者の育成と考えられる。QT延長の評価に関しては、更なるステップとしてガイドラインS7BがICHの新トピックスとして取り上げられ、ハーモナイズが進められている。また他の研究機関ではヒトへの予測性を高めるためHERG遺伝子(ヒトI_{kr}チャンネルのサブユニット)を発現させた細胞での評価を実施している。今後はこれら最新技術の情報もタイムリーに取り入れ、当研究所での安全性薬理評価体制の充実を図りたいと考える。

引用文献

- 1)厚生省：新医薬品等の製造(輸入)承認申請に必要な一般薬理試験のガイドラインについて、薬新薬第4号(1991)
- 2)ICH Topics and guidelines：M3 Timing of Pre-clinical studies in relation to clinical trials (1997)
- 3)ICH Topics and guidelines：S7 Safety pharmacology studies(2000)
- 4)Johansson B：Central and peripheral hemodynamics. In "The use of pharmacology studies in drug safety assessment-present situation and future perspectives."(Edited by Sundwall A., Johansson B., Lindbom L., Sjöberg P.), pp.37 - 44, Tryckgruppen, Stockholm, Sweden (1995)
- 5)曾我部博文：医薬品開発基礎講座V 7薬効の評価(1)薬理試験法<中>, 地人書館, 443(1974)
- 6)Davies AJ, et al：BMJ, 298, 325(1989)
- 7)Tamargo J：Jpn J Pharmacol, 83, 1(2000)
- 8)Honig PK, et al：J Clin Pharmacol, 33, 1201 (1993)
- 9)Neher E, et al：Nature, 260, 799(1976)
- 10)Rao KA, et al：Mayo Clin Proc, 69, 589(1994)
- 11)Goss JE, et al：Arch Intern Med, 153, 2705 (1993)
- 12)Kii Y, et al：Arch int Pharmacodyn, 331, 59 (1996)
- 13)Salata JJ, et al：Circ Res, 76, 110(1995)



三野 照正

Terumasa Mino

住友化学工業株式会社
生物環境科学研究所 応用生物グループ
主席研究員, 医学博士



杉本 眞一

Shin-ichi Sugimoto

住友化学工業株式会社
生物環境科学研究所 応用生物グループ
研究員



野田 有宏

Tomohiro Noda

住友化学工業株式会社
生物環境科学研究所 応用生物グループ
主任研究員



中野 実

Minoru Nakano

住友化学工業株式会社
生物環境科学研究所 応用生物グループ
主席研究員



辻本 伸治

Shinji Tsujimoto

住友化学工業株式会社
生物環境科学研究所 応用生物グループ
主任研究員