

＜第9回JBFシンポジウム＞

毒性評価における マイクロサンプリングの 有用性と留意点について



**医薬品医療機器総合機構
(毒性領域)**

西村 次平

本発表は、発表者の個人的見解に基づくものであり、独立行政法人医薬品医療機器総合機構の公式見解を示すものではありません。

In connection with this presentation, there is no COI to be disclosed with any companies.

本演題に関連して開示すべき利益相反はありません。

本日の内容

- 1. 毒性試験と曝露評価**
- 2. マイクロサンプリングの有用性と留意点について**
- 3. まとめ**

本日の内容

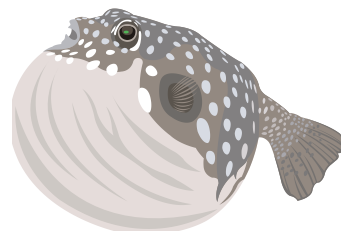
1. 毒性試験と曝露評価

2. マイクロサンプリングの有用性と留意点について

3. まとめ

毒性とは . . .

動物毒



植物毒



As



Pb



鉱物毒

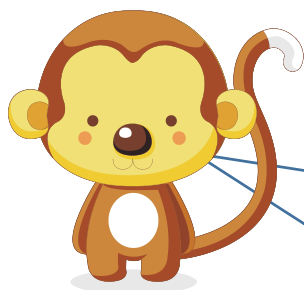


毒性とは . . .



Paracelsus
(1493-1541)

**「すべての物質には毒性がある
毒性のないものはない
用量が毒か薬かを区別する」**



**現在では、毒性の発現には用量だけではなく、
生体側の様々な要因（感受性や動態の違い）
が関与していることも理解されている**

化学物質と法令

分類	関連する主な法令	摂取（曝露）の程度
一般化学物質	毒物及び劇物取締法 労働安全衛生法 化学物質審査規制法	意図的に摂取することはないが、 環境経路 による摂取の可能性がある (曝露は低い)
環境汚染物質	化学物質排出把握管理促進法 大気汚染防止法 水質汚濁防止法 土壌汚染対策法 ダイオキシン類対策特別措置法	
食品添加物	食品衛生法	副次的 に摂取する (曝露は低い) 
農薬	食品衛生法、農薬取締法	
医薬品	薬機法	意図的 に摂取する (曝露は高い) 

化学物質の毒性

化学物質の用途によって毒性の判断は異なる

分類	ヒト健康へのベネフィット	毒性の判断
一般化学物質 環境汚染物質	ベネフィットなし 	原則として、 <u>すべての生体影響は毒性</u>
食品添加物 農薬等	直接的な ベネフィットはない 	
医薬品	ベネフィットあり 	<u>生体影響の中で有用なものは薬効、有用でないものは毒性</u>

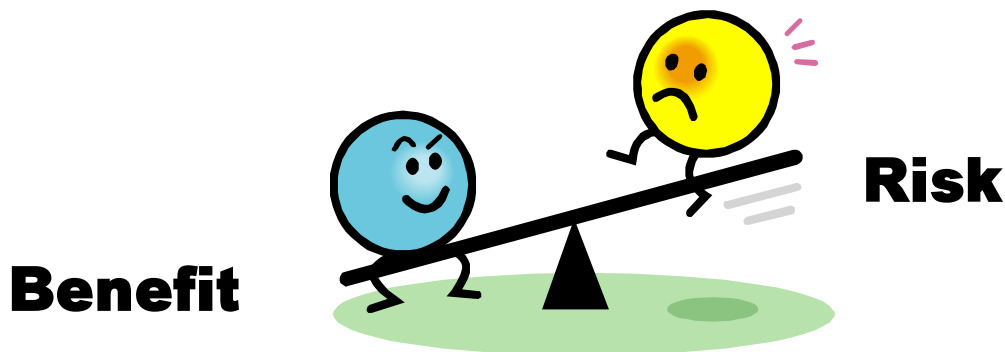
医薬品における毒性評価の考え方

医薬品の薬理作用

- 有用なものは薬効
 - 有害なものは毒性
- 表裏一体

- ↓
- 毒性があってもあたり前
- ↓

リスクを最小、ベネフィットを最大



TKガイダンス策定の経緯 ①

医薬品における毒性評価 (TKガイダンス策定以前)

$$\text{安全域 (用量/体重)} = \frac{\text{無毒性量 (mg/kg)}}{\text{臨床用量 (mg/kg)}}$$

$$\text{安全域 (用量/体表面積)} = \frac{\text{無毒性量 (mg/m}^2\text{)}}{\text{臨床用量 (mg/m}^2\text{)}}$$

個体差、性差、系統差、種差、環境等の内的、外的要因により、動物からヒトへの外挿がしばしば困難な事態が発生・・・

⇒吸収・分布・代謝・排泄に及ぼす種々の要因の相違から、動物における毒性発現に差が生じることが明らかとなってきた

TKガイダンス策定の経緯 ②

- **1980年後半**
毒性データと曝露データを結びつけて考察することの重要性が認識
- **1994年10月27日 ICH S3A ステップ4**
- **1996年7月2日**
トキシコキネティクス（毒性試験における全身的曝露の評価）に関するガイダンスについて
（薬審第443号、厚生省薬務局審査課課長通知）
- **2017年11月16日 S3A Q&A ステップ4**

毒性評価とTK評価

有害性確認 (Hazard Identification)

動物試験等から**毒性の種類を特定**する

用量反応評価 (Dose-response Assessment)

毒性発現の用量反応性を評価して、**有害影響を示さないと推定される量**を求める

曝露評価 (Exposure Assessment)

動物並びにヒトが摂取した時の曝露量を算出・推定する

リスク判定 (Risk Characterization)

対象化学物質の**安全性を評価**

リスク評価と安全域

(例)

Species, Study type and Doss	AUC _{0-24h} (h * ng · h/mL)	Safety margin
Human (300mg/day)	4567	—
Repeated Dose Toxicity		
Rat, 26-week		
300 mg/kg/day	145600	31.9
100 mg/kg/day (NOAEL)	45678	10.0
30 mg/kg/day	12345	2.7
Monkey, 39-week		
300 mg/kg/day	23456	5.1
100 mg/kg/day (NOAEL)	5678	1.2
30 mg/kg/day	1234	0.3

安全域
(曝露マージン)

=

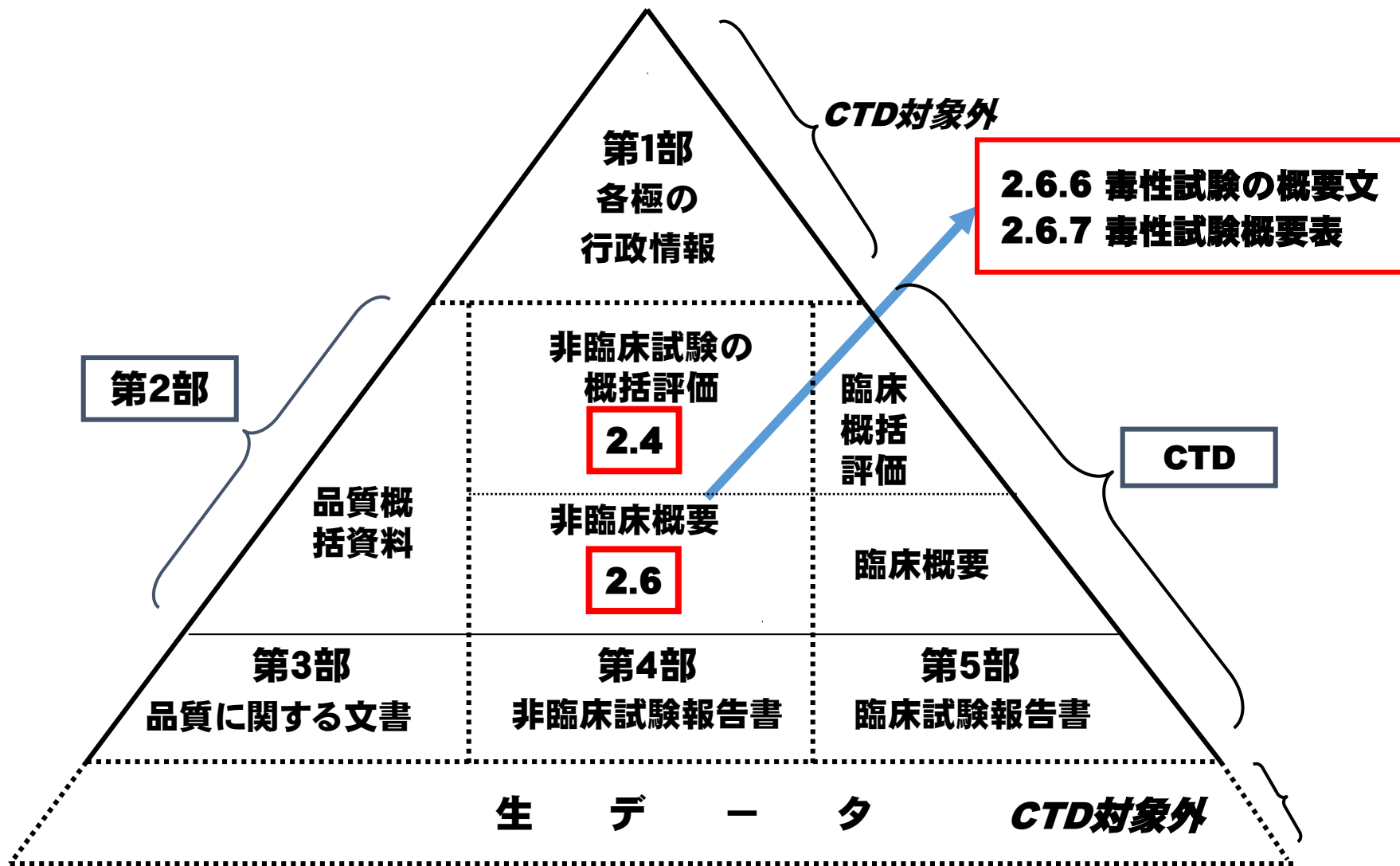
ヒトに有害影響を示さないと
推定される曝露量



ヒトでの曝露量



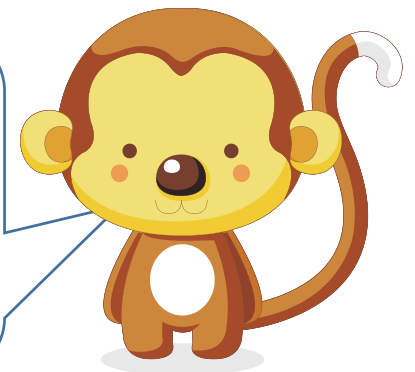
申請資料：国際共通化資料/概念図



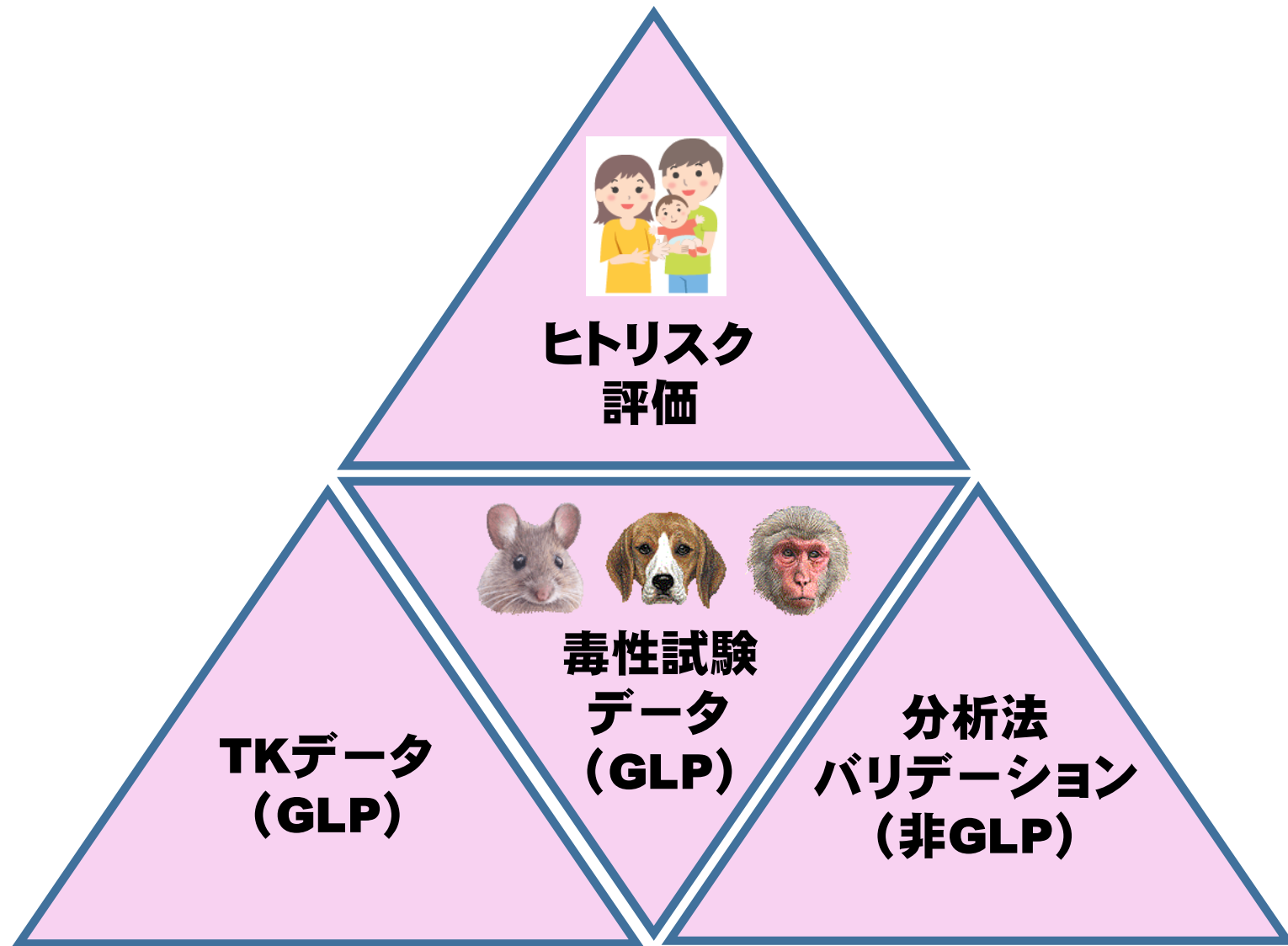
CTD作成要領（非臨床毒性部分）

- **2.6.7.1 毒性試験：一覧表**
- **2.6.7.2 トキシコキネティクス：**
 - **2.6.7.2.1 トキシコキネティクス 試験の一覧表**
 - **2.6.7.2.2 トキシコキネティクス 試験成績一覧表**
- **2.6.7.3 毒性試験 使用ロット**
- **2.6.7.4～ 各種毒性試験成績**

**TKデータは、
毒性試験情報の何よりも先に登場する!!
毒性評価は適切な曝露評価が前提で
成り立っている!!**



毒性試験と曝露評価



本日の内容

1. 毒性試験と曝露評価
- 2. マイクロサンプリングの有用性と留意点について**
3. まとめ

ICH S3A Q&Aが導入されることにより何が変わるのか？

TKガイダンス策定の経緯 ②

- **1980年後半**
毒性データと曝露データを結びつけて考察することの重要性が認識
- **1994年10月27日 ICH S3A ステップ4**
- **1996年7月2日**
トキシコキネティクス（毒性試験における全身的曝露の評価）に関するガイダンスについて
（薬審第443号、厚生省薬務局審査課課長通知）
- **2017年11月16日 S3A Q&A ステップ4**

ICH S3A Q&Aの背景

- トキシコキネティクス（TK）評価
 - 従来法では、200 μ L以上の採血が必要！！
 - げっ歯類を用いた毒性試験でTK測定を実施する場合、
サテライト動物から採血する必要があった
- ICHでは、動物福祉、3Rs（Replacement：代替、Refinement：苦痛の軽減、Reduction：削減）の推進が奨励されている
- 測定機器の分析感度が向上することで、マイクロサンプリング技術をTK評価に利用することが可能となった

有用性：動物福祉への貢献

動物愛護法 第41条



削減

REDUCE
number of animals



置換

REPLACE
with other options



苦痛軽減

REFINE
test to ensure most humane

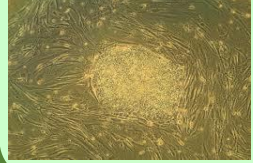


生殖発生毒性試験の代替法（議論中）

in vitro

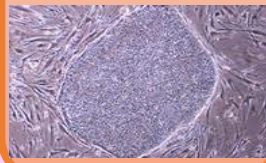
マウス

ES細胞



ヒト

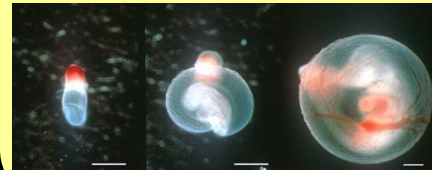
ES細胞



ex vivo

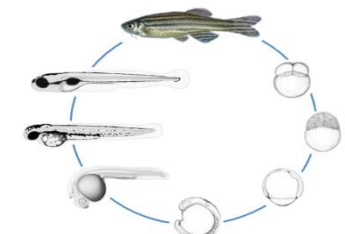
ラット

全胚培養法



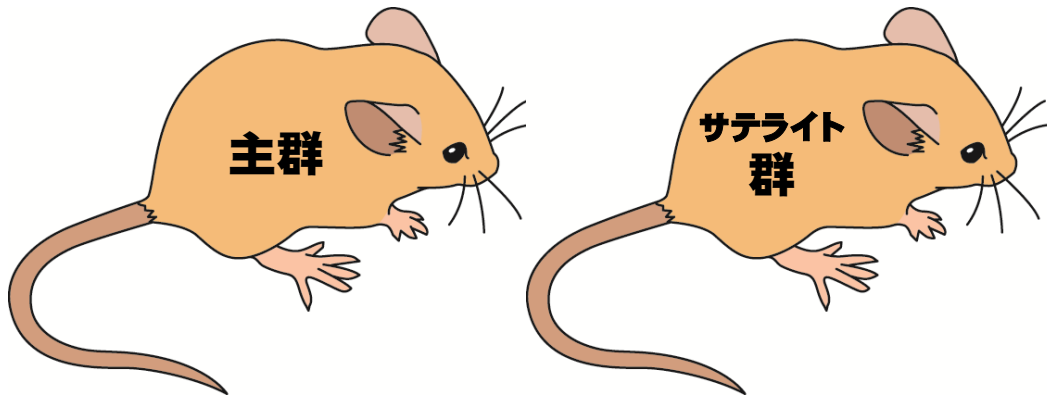
in vivo

ゼブラフィッシュ



有用性：毒性評価の質的向上

従来法



毒性評価パラメータ

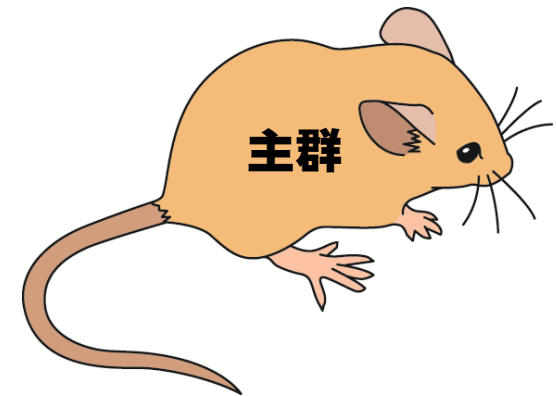
一般状態
血液検査
血液化学的検査
尿検査
病理検査
...



TKパラメータ

血中濃度
AUC
...

マイクロサンプリング法



毒性評価パラメータ

一般状態
血液検査
血液化学的検査
尿検査
病理検査
.....

TKパラメータ

血中濃度
AUC

有用性：毒性評価の質的向上

各試験で用いられる主な動物種の例

毒性試験	げっ歯類				非げっ歯類			
	マウス	ラット	ハムスタ-	モルモット	イヌ	サル	ウサギ	ミニブタ
								
単回	○	○			△	△		
反復	○	○			○	○	点眼○	△
遺伝毒性	○	○						
がん原性	○	○						
生殖発生	○	○				△	○	
幼若動物	○	○			○	○		○
刺激性			口腔○				○	経皮○
感作性				○				
光毒性	△			○				
依存性		○				○		

従来法とマイクロサンプリング法

ICH S3A

従来法

200 μ L以上

分析法

バリデーション

血液試料の採取

前処理

測定

解析並びに各種パラメータの算出

ICH S3A Q&A
マイクロサンプリング

50 μ L以下

-
-
-
-

マイクロサンプリング法の留意事項 ー分析に関してー

- **マイクロサンプリング技術を導入する際には、分析結果の信頼性を保証しうる分析法の開発及び適格化が必要!!**
 - **適切な測定法であることが前提**
 - 場合によっては（薬物濃度が低い場合や測定試料の大部分/すべてが定量限界未満である等）、分析法の妥当性が問われる可能性があることに留意
 - **考慮すべき事項**
 - **再測定の可能性は？（量、規制上の観点）**
 - **ISRの必要性は？（量、規制上の観点）**
 - **代謝物の測定の必要性は？（量、技術、規制、毒性学的観点）**
- 等**

マイクロサンプリング法の留意事項 －毒性評価に関して－

➤ 主試験群から血液をサンプリングする場合

- 血液採取の影響が動物の生理的状态に影響を及ぼす懸念の有無を考慮する必要がある
- 留意すべき主な因子
 - ◆ 一定期間中における採血量と採血回数、採血デザイン
 - ◆ 用いる試験系（例えば、種、週齢、体重、総血液量）
 - ◆ 被験物質の特性（赤血球への影響や抗凝固剤としての性質等）
 - ◆ 採血部位



試験系及び検査結果のまとめ

動物種	系統	雌雄	日齢, 週齢	体重(g)**	試験系				採取日	検査日	部位	検査項目及び結果			
					採血量(uL)		採血量 割合(%)***	血液学的検査				血液化学 AST	組織重量	病理組織	
					量×回数	合計		RBC							HEM
ラット ¹⁾	SD	♀	8W	200	50×6	300	2.3	D1	D2	伏在静脈	-	-	-	-	
					100×6	600	4.7	D1	D2	伏在静脈	-	-	-	-	
					200×6	1200	9.4	D1	D2	伏在静脈	11-15%減	1.6倍に増	-	-	
			8W	200	200×6	1200	9.4	D1	D2	尾静脈	D1: 経時的に減, D2: 11-15%減	1.5倍に増	-	-	
			12W	250	200×6	1200	7.5	D1	D2	尾静脈	D1: 経時的に減, D2: 11-15%減	1.5倍に増	-	-	
ラット ²⁾	Wistar (Han)	♀	19D	40	32×3	96	3.8	D1	D2	尾静脈	有意に低下だが、標準範囲内		-	-	
			37D	95	32×3	96	1.6	D1	D2	尾静脈	-	-	脾臓増, 肝減	-	
ラット ³⁾	Wistar (Han)	♂♀	10 W	♂250, ♀180	32×6	192	♂1.2, ♀1.7	D1, D14	D15	尾静脈	-	-	-	-	
					200×6	1200	♂8, ♀10	D1, D14	D15	尾静脈	減	増(GLDHも)	雄・肝減	-	
ラット ⁴⁾	Wistar	♂♀	?	♂339, ♀231	25×3+70	145	♂0.7, ♀1	D1	D3	尾静脈	-	-	-	-	
					250×5	750	♂6, ♀9	D1	D3	尾静脈	8-14%減	-	-	-	
ラット ⁵⁾	Wistar (Han)	♂♀	4D	♂10, ♀10	32×2	64	10	D1	D7	頬静脈	-	-	-	-	
					32×3	96	15	D1	D7	頬静脈	-	10%減	-	-	-
			10D	♂24, ♀24	32×3	96	6.3	D1	D2	頬静脈	-	20%減	-	-	-
					32×3	96	6.3	D1	D7	頬静脈	-	-	-	-	-
					32×3	96	4	D1	D2	頬・尾・頸静脈	10-18%減	20%減	15-20%減	-	-
	32×3	96	4	D1	D7	頬・尾・頸静脈	-	-	-	-	-				
マウス ⁶⁾	?	?	?		10×8	80	?	不明	不明	尾静脈	-(減であったが、有意差なし)		-(肝のみ)	-	

**charles riverのSDラット長期モニタリングデータ、Charles riverのWistar Hanのグラフ、あるいは文献値を記載

***全血液量は体重の6.4%として計算

- ・血液学的検査の値が、採血量の増加に対して最も高感度に反応するパラメータである
- ・採血量が翌日の血液学的検査で生理学的データに影響を及ぼし始めるのは4%以上

- 1) Regul Toxicol Pharmacol. 2015 Aug;72(3):429-39
- 2) Regul Toxicol Pharmacol. 2014 Aug;69(3):425-33
- 3) Regul Toxicol Pharmacol. 2014 Apr;68(3):325-31
- 4) Bioanalysis. 2012 Mar;4(6):661-74
- 5) Toxicol Sci. 2016 Nov;154(1):69-77
- 6) Bioanalysis. 2012 Dec;4(23):2775-9

「マイクロサンプリングに関する生体試料中薬物濃度分析(バイオアナリシス)手法の標準化」研究班 マイクロサンプリング(低分子医薬品) サブグループ 第1回 班会議資料より

マイクロサンプリング基盤技術(低分子医薬品)に関する計画説明と今後の進め方

・ 尾静脈採血と頸静脈採血の相違(参考資料)

1) Vangala et. al., SOJ Pharm Pharmacol Sci, 2015;2;1-10 (Dapson: logP=0.97、経口投与、血漿)

Male SD Rat		頸静脈	伏在静脈	眼窩静脈叢	P>0.05 静脈内投与でも同様
Dapson	AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$)	45.4	51.7	38.6	
	Cmax ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	5.54	5.33	4.60	

2) Hui et. al., J Pharmacol Toxicol Method, 2007;56;256-64 (経口投与、血漿) 赤字間 P<0.05

Male SD Rat		尾静脈	眼窩静脈叢	大腿動脈	logP=0.29
Pentoxifylline	AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$)	0.14	0.14	0.11	
	Cmax ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.12	0.18	0.19	

Male SD Rat		尾静脈	眼窩静脈叢	大腿動脈	logP=3.4
Gemfibrozil	AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$)	29.0	41.9	24.9	
	Cmax ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	5.2	7.5	3.5	

Male SD Rat		尾静脈	眼窩静脈叢	大腿動脈	logP=1.59
Clonidine	AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$)	0.024	0.027	0.024	
	Cmax ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.003	0.005	0.003	

Male SD Rat		尾静脈	眼窩静脈叢	大腿動脈	logP=1.91
Glipizide	AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$)	308	299	458	
	Cmax ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	29	29	40	

「マイクロサンプリングに関する生体試料中薬物濃度分析(バイオアナリシス)手法の標準化」研究班 マイクロサンプリング(低分子医薬品) サブグループ 第1回 班会議資料より

マイクロサンプリング基盤技術(低分子医薬品)に関する計画説明と今後の進め方

・ 尾静脈採血と頸静脈採血の相違(参考資料)

2) Hui et. al., J Pharmacol Toxicol Method, 2007;56;256-64 (経口投与、血漿) 赤字間 P<0.05

Male SD Rat		尾静脈	眼窩静脈叢	大腿動脈	
Methotrexate	AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$)	2.00	2.05	1.11	logP=-1.85
	Cmax ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.32	0.32	0.37	

Male SD Rat		尾静脈	眼窩静脈叢	大腿動脈	
Fluoxetine	AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$)	1.33	2.23	1.78	logP=4.05
	Cmax ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.110	0.291	0.263	

3) Korfmacher et. al., J Pharmacol Toxicol Method, 2015;76;7-14 (経口投与、全血) P>0.05

Male SD Rat		頸静脈	尾静脈	
Fluoxetine	AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$)	3.01	2.98	logP=3.5
	Cmax ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.468	0.344	
Norfluoxetine	AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$)	14.9	15.4	
	Cmax ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.712	0.690	
Glipizide	AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$)	34.4	33.5	
	Cmax ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	3.70	3.33	

4) Said et. al., Open Pharmacol J, 2007;1;30-15 (Cyclophosphamide: logP=0.8、腹腔内投与、全血)

Male MRI mice		尾静脈	眼窩静脈叢	
Cyclophosphamide	AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$)	56.6	61.3	P>0.05
	Cmax ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	78.7	81.3	

マイクロサンプリング法の留意事項 －毒性評価に関して－

➤ 主試験群から血液をサンプリングする場合

➤ 試験に用いる採血条件が、生体の生理学的状態に影響を及ぼさないことが重要

(背景データは重要!!)

➤ 考慮すべき要因

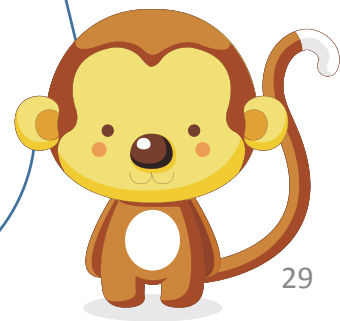
- 被験物質の特性

〔血液系に作用する薬物（薬力学/毒性学的）、心血管系に影響する薬物等〕

- 対象とする試験

主試験に小核（骨髄）評価を含む場合

等



マイクロサンプリング法の留意事項 ー毒性評価に関してー

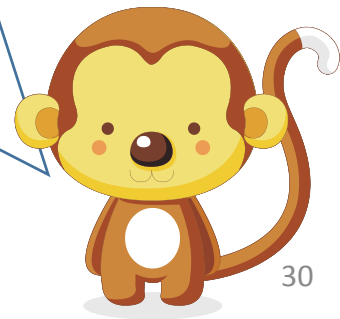
➤ 主試験群から血液をサンプリングする場合

➤ 考慮すべき要因（続き）

● 採血デザイン

- ・ 主群の全動物から採血する
- ・ 主群のあらかじめ決められた特定の動物（一部）から採血する
- ・ 主群の全動物で採血量が均等になるよう、採血時点ごとに動物を替えて採血する（スパースサンプリングを利用）
- ・ 試験の状況に応じて、臨機応変に採血する

等



本日の内容

1. 毒性試験と曝露評価
2. マイクロサンプリングの有用性と留意点について
- 3. まとめ**

まとめ

- **マイクロサンプリング技術は、TKに係わる基本的な考え方（ICH S3A）に影響を与えるものではない。**
- **マイクロサンプリング技術を用いる場合は、従来法と同じく、適切な分析法に基づくことが前提となる。**
- **マイクロサンプリング技術を主群を対象とした毒性試験に用いる際には、生体影響の有無に関する背景情報、採血デザイン、被験物質の特性などを考慮する必要がある。**
- **マイクロサンプリング法についての基本的な留意点は、ICH S3A Q&Aに記載されていますが、マイクロサンプリング法を使用するに当たり、懸念がある場合は、必要に応じて、機構の対面助言制度を利用してください。**
- **マイクロサンプリング技術が普及することにより、より良い毒性評価になることを期待します。**