

医薬品開発における遺伝毒性 の予測とリスク評価

Enhancing safety and quality of life
through scientific research



本間正充（国立医薬品食品衛生研究所）

本日のトピック

- ◆ 医薬品開発における遺伝毒性試験
- ◆ 何故、今、遺伝毒性QSARなのか？
- ◆ 遺伝毒性不純物のリスク評価・管理と、(Q)SARの利用

遺伝毒性試験の目的

1. がん原生の予測
2. 次世代に遺伝される毒性の予測
3. 生体内での作用の評価
4. 環境モニタリング

新薬の研究開発の流れ

創薬研究

- 標的受容体の同定
- スクリーニング試験
- 候補化学物質の最適化

非臨床試験 (動物試験)

- 薬効薬理試験
- 毒性試験
- 安全性試験

臨床試験

- 第1相試験
- 第2相試験
- 第3相試験

承認申請

審査

発売

期間

5 ~ 8 年

3~7 年

2~3 年



非臨床試験

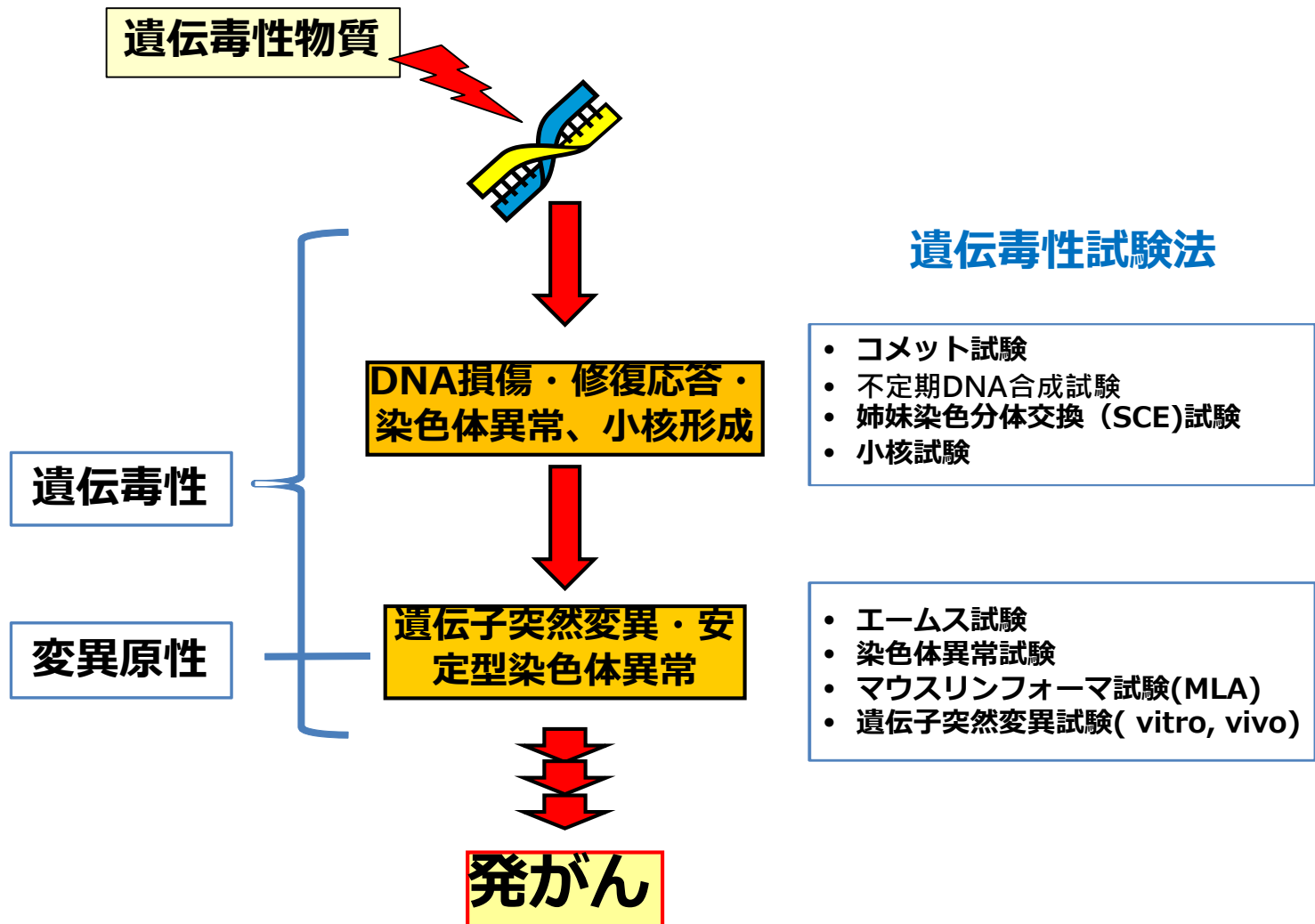
I. 薬理試験

II. 薬物動態試験

III. 毒性試験

- ① 単回投与毒性試験
- ② 反復投与毒性試験
- ③ 遺伝毒性試験
- ④ がん原性試験
- ⑤ 生殖発生毒性試験
- ⑥ その他の毒性試験

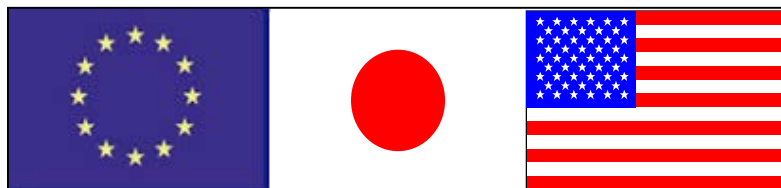
遺伝毒性とその試験法



主な遺伝毒性試験OECDガイドライン

●No.471	細菌を用いる復帰突然変異試験	1997
●No.473	培養細胞を用いる染色体異常試験	1997
●No.474	骨髄あるいは末梢血の赤血球を用いる小核試験	1997
●No.475	骨髄細胞を用いる染色体異常試験	1997
●No.476	培養細胞を用いる体細胞突然変異試験 (MLAを含む)	1997
●No.477	ショウジョウバエを用いる伴性劣性致死試験	1984
●No.478	げっ歯類を用いる優性致死試験	1984
●No.479	哺乳類細胞を用いる姉妹染色分体交換試験(SCE)	1986
●No.480	酵母菌を用いる突然変異試験	1986
●No.481	酵母を用いる有糸分裂組換え試験	1986
●No.482	培養細胞を用いるDNA損傷、修復および不定期DNA合成(UDS)試験	1986
●No.483	哺乳類の精原細胞を用いる染色体異常試験	1997
●No.484	マウスを用いる毛色スポットテスト	1986
●No.485	マウスを用いる遺伝性(相互)転座試験	1986
●No.486	哺乳類肝臓細胞を用いるin vivo不定期DNA合成(UDS)試験	1997
●No.487	哺乳類肝臓細胞を用いるin vitro 小核試験	2010
●No.488	トランスジェニック動物突然変異試験	2011
●No.	In vivoコメット試験	2013

医薬品に関する遺伝毒性試験の標準的組み合わせ



In vitro試験

In vivo試験

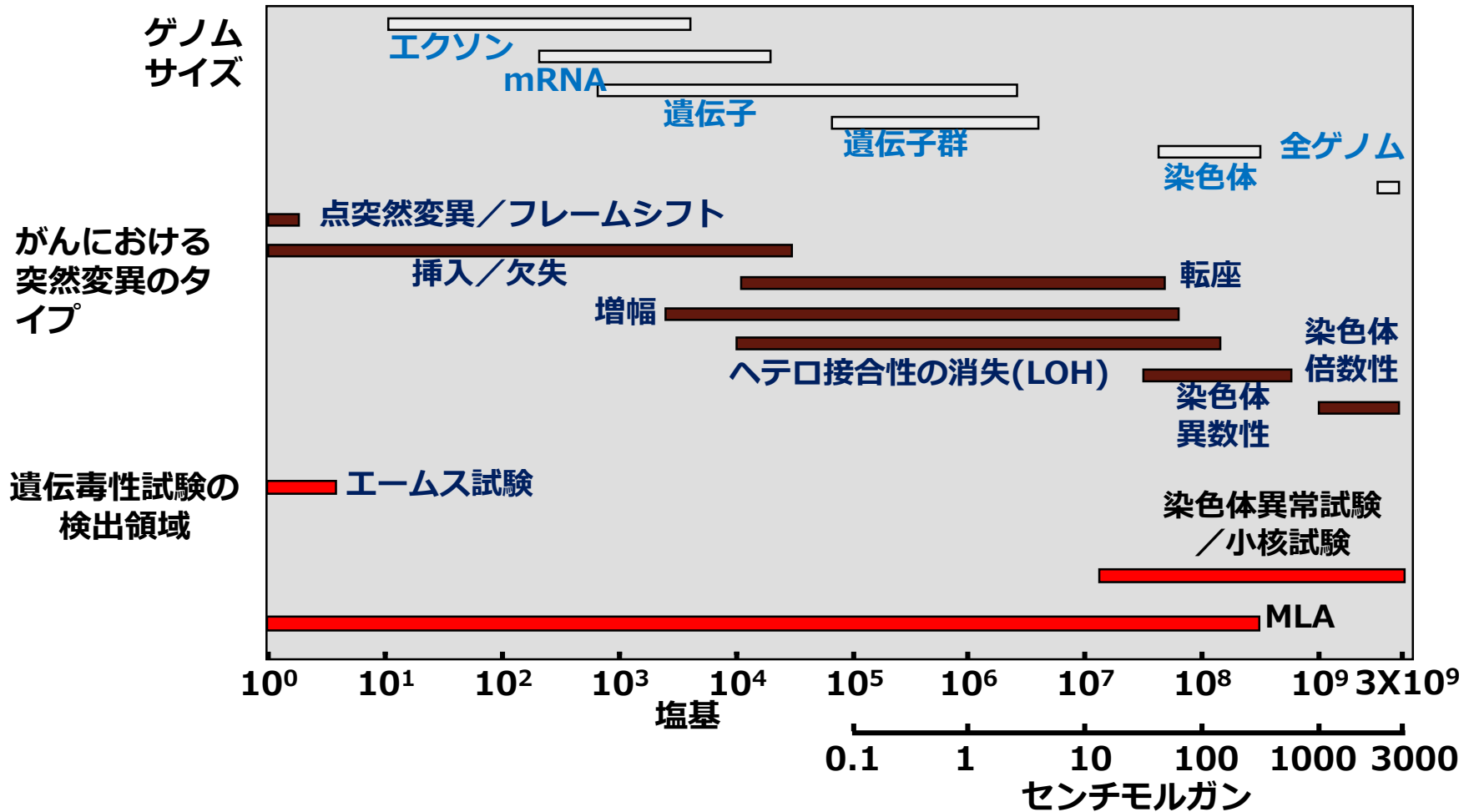
1. エームス試験

3. 骨髄での小核試験

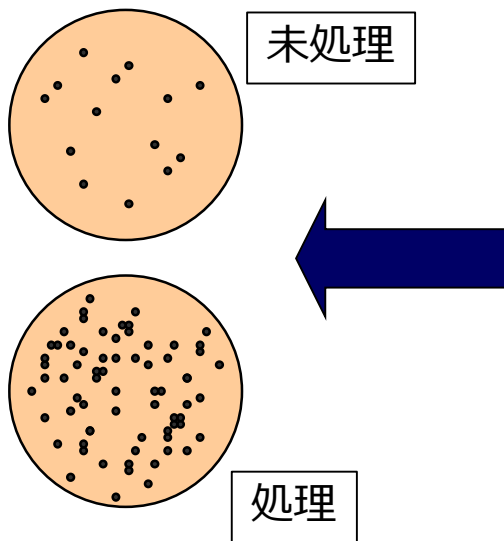
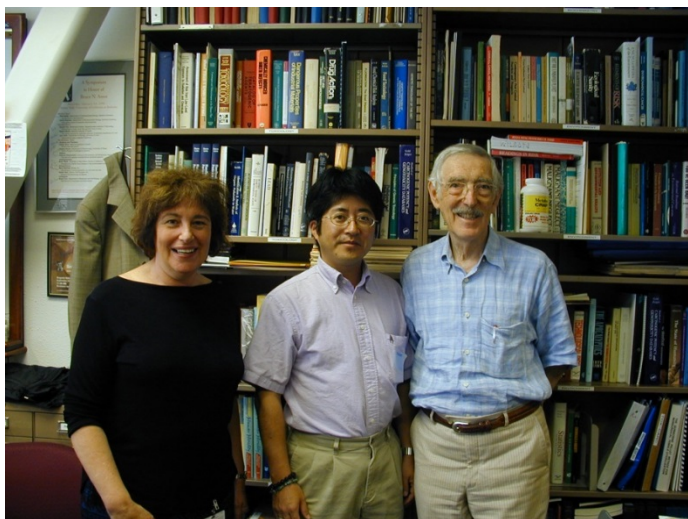
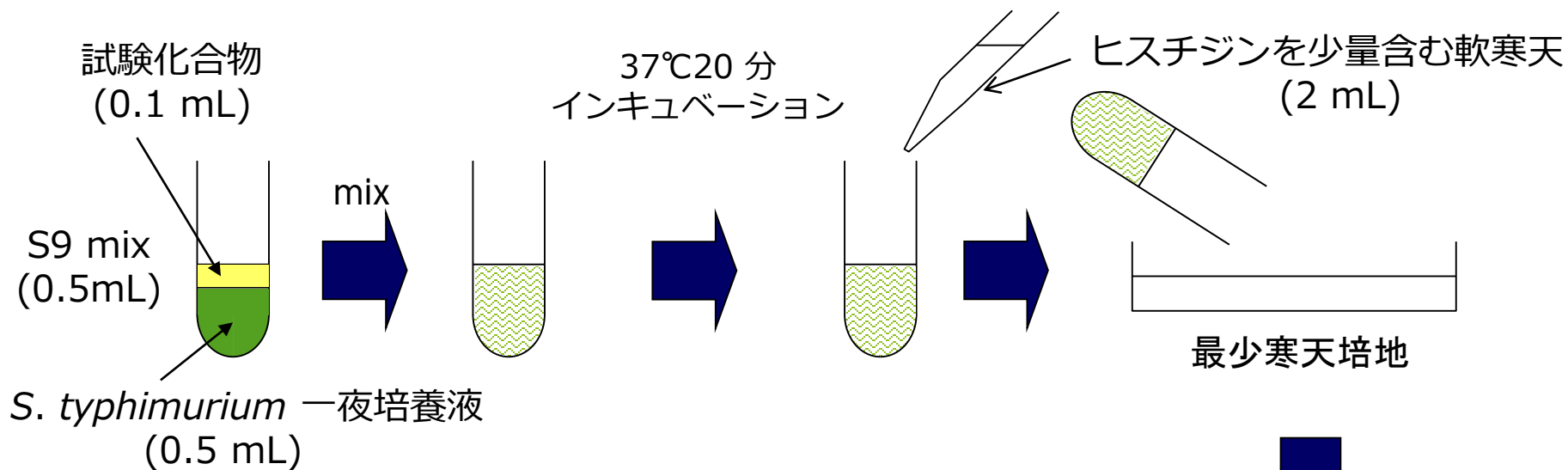
2. ほ乳類細胞試験 (以下のいずれか1つ)

- 染色体異常試験
 - マウスリンフォーマ試験
 - 小核試験
-

ゲノムサイズからみた遺伝毒性試験の検出範囲



エームス試験

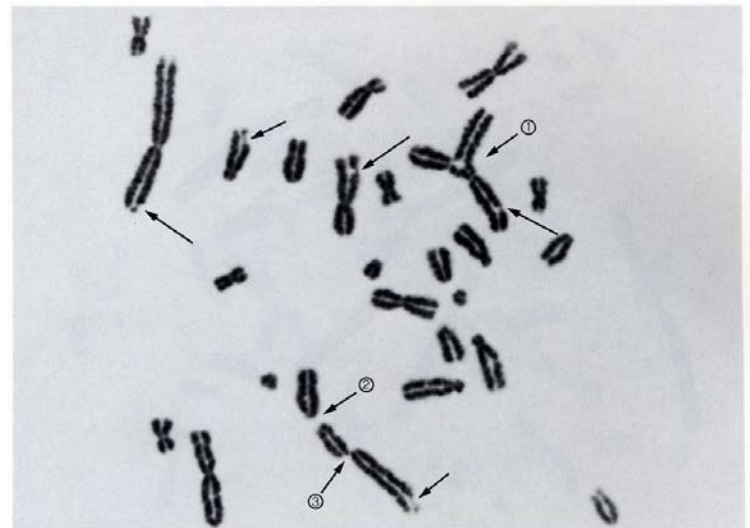


染色体異常試験 (in vitro)

- チャイニーズハムスター細胞株 (CHL, CHO, V79など)、ヒトリンパ球細胞を用い、*in vitro*で化学物質の染色体異常誘発性を調べる試験
- 増殖期の細胞を化学物質に暴露→コルセミドにより分裂を中期で止める→染色体 (染色分体) の数・構造の異常を調べる



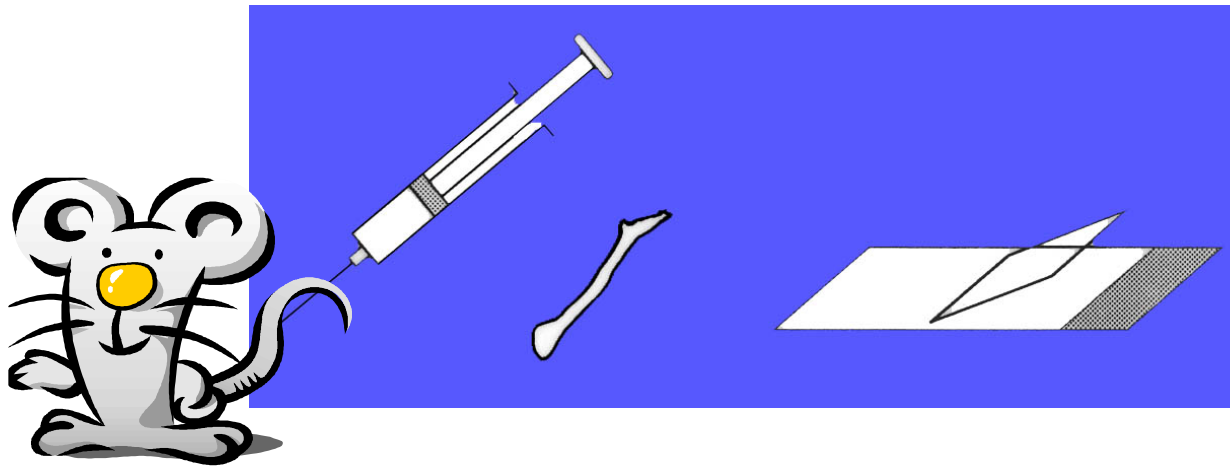
未処理



遺伝毒性物質処理

小核試験 (in vivo骨髄、血液)

マウスに化学物質投与→骨髄塗抹作製→多染性赤血球中の小核を有するものの割合を求める

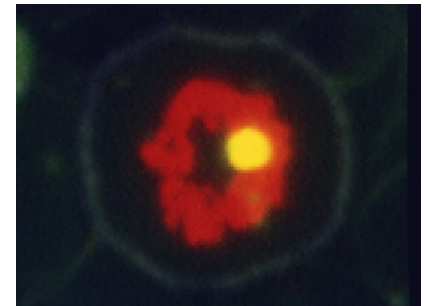
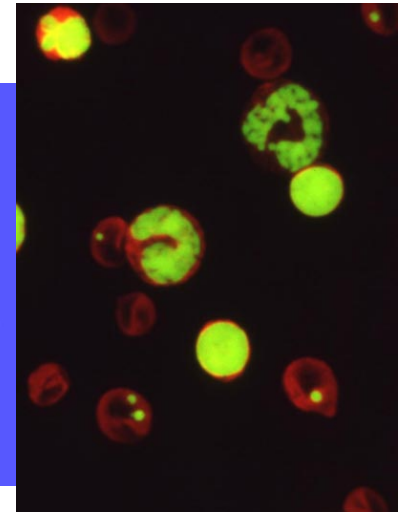


験体投与

骨髄細胞

塗抹
固定
染色

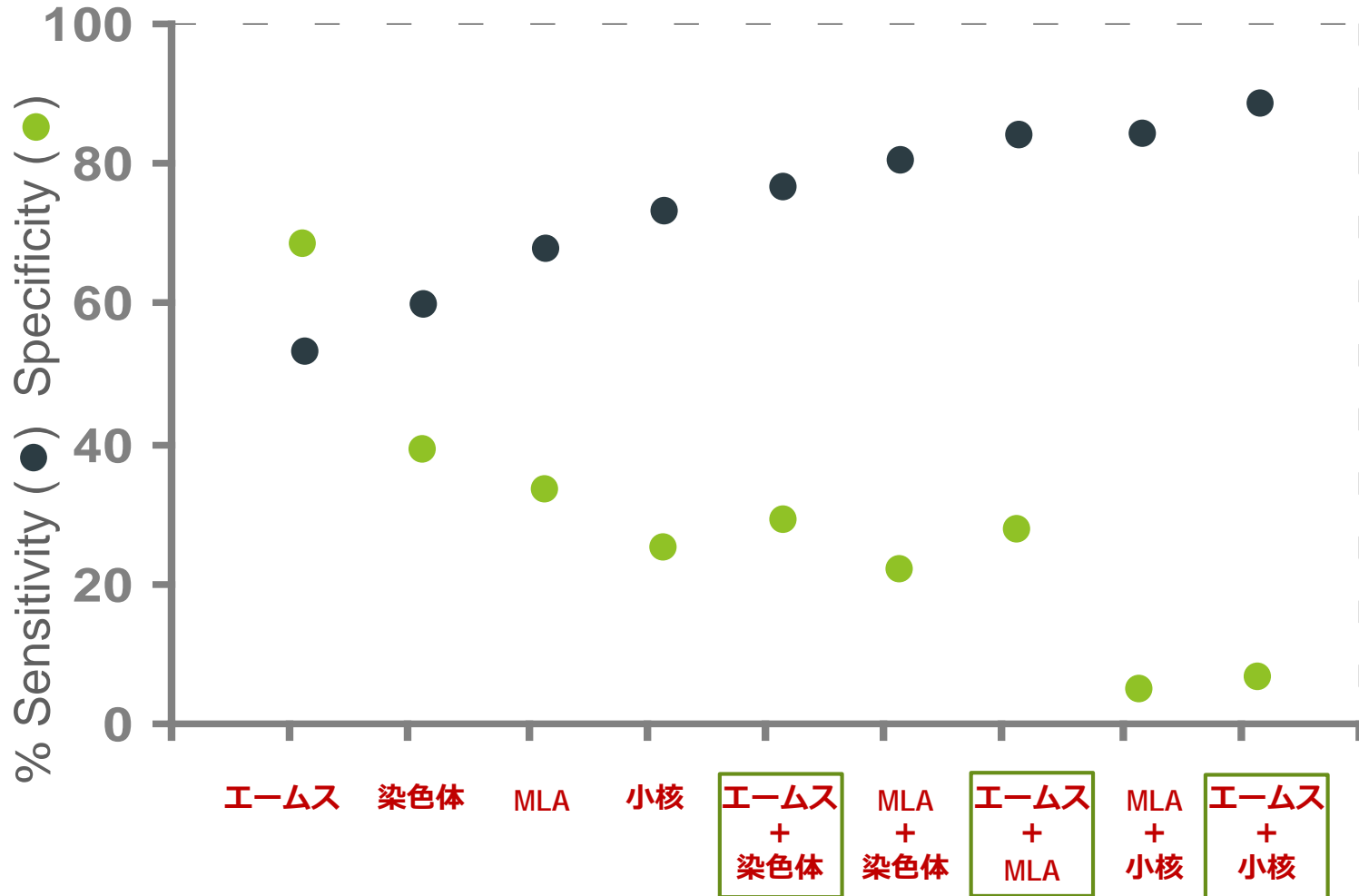
観察



In vitro 遺伝毒性試験と、げっ歯類発がん性試験の一致率 (%)

論文		エームス	MLA	染色体異常	小核
Krikland et al., Mutat. Res. 584, 1, 2005	Sensitivity 陽性一致率	58.8	73.1	65.6	78.7
	Specificity 陰性一致率	73.9	39.0	44.9	30.8

Sensitivity vs. Specificity



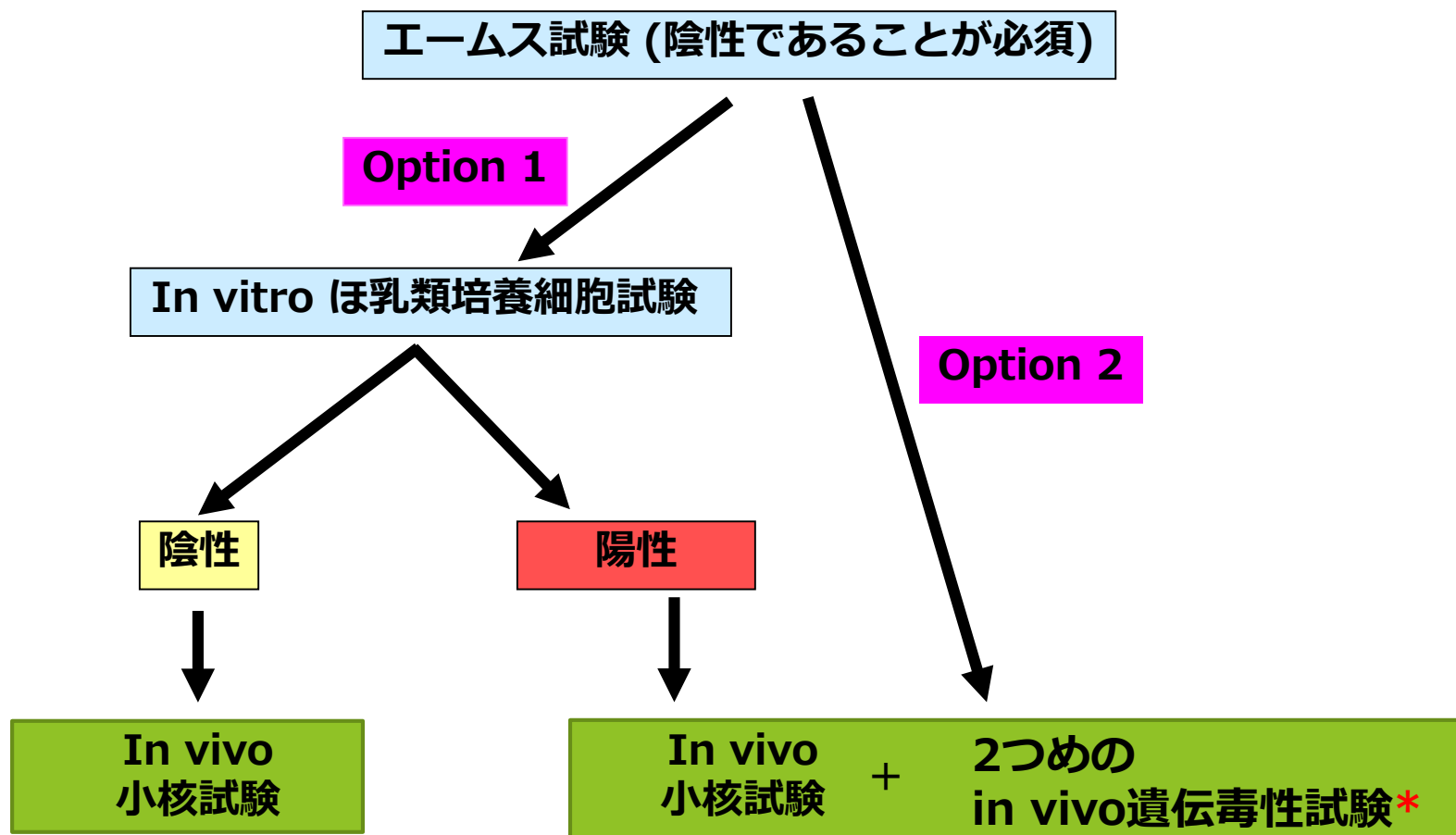
何故、低いSpecificityが問題か？

- 偽陽性により、医薬品候補化合物の脱落率が多くなる。
- ヒトへの発がんリスクが無いことを証明するためには、追加のin vivo試験が必要である。
 - 医薬品の開発が遅れる。
 - 追加の動物実験は3R*に反する。

*3R's in animal experiments

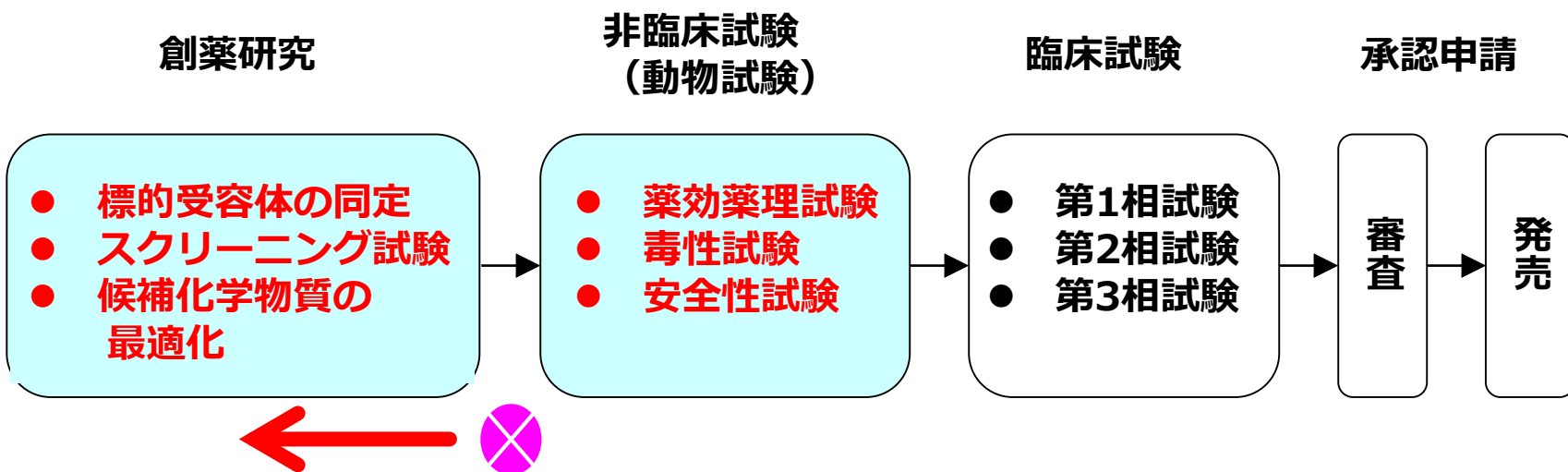
- Replacement
- Reduction
- Refinement

医薬品に関する遺伝毒性試験の標準的組み合わせのオプション ICH-S2R1 (2011)



*肝臓でのコメット試験、もしくはトランスジェニック動物での遺伝子突然変異試験

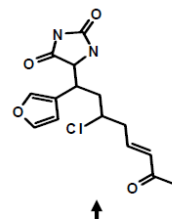
候補化合物選択のための新たなストラテジー



Integrated (Intelligence) Test System

- **In silico**
- **Omics**
- **Highthrough-put assay**
- **Biomarker, AOP, etc**

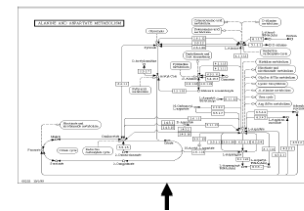
Structure



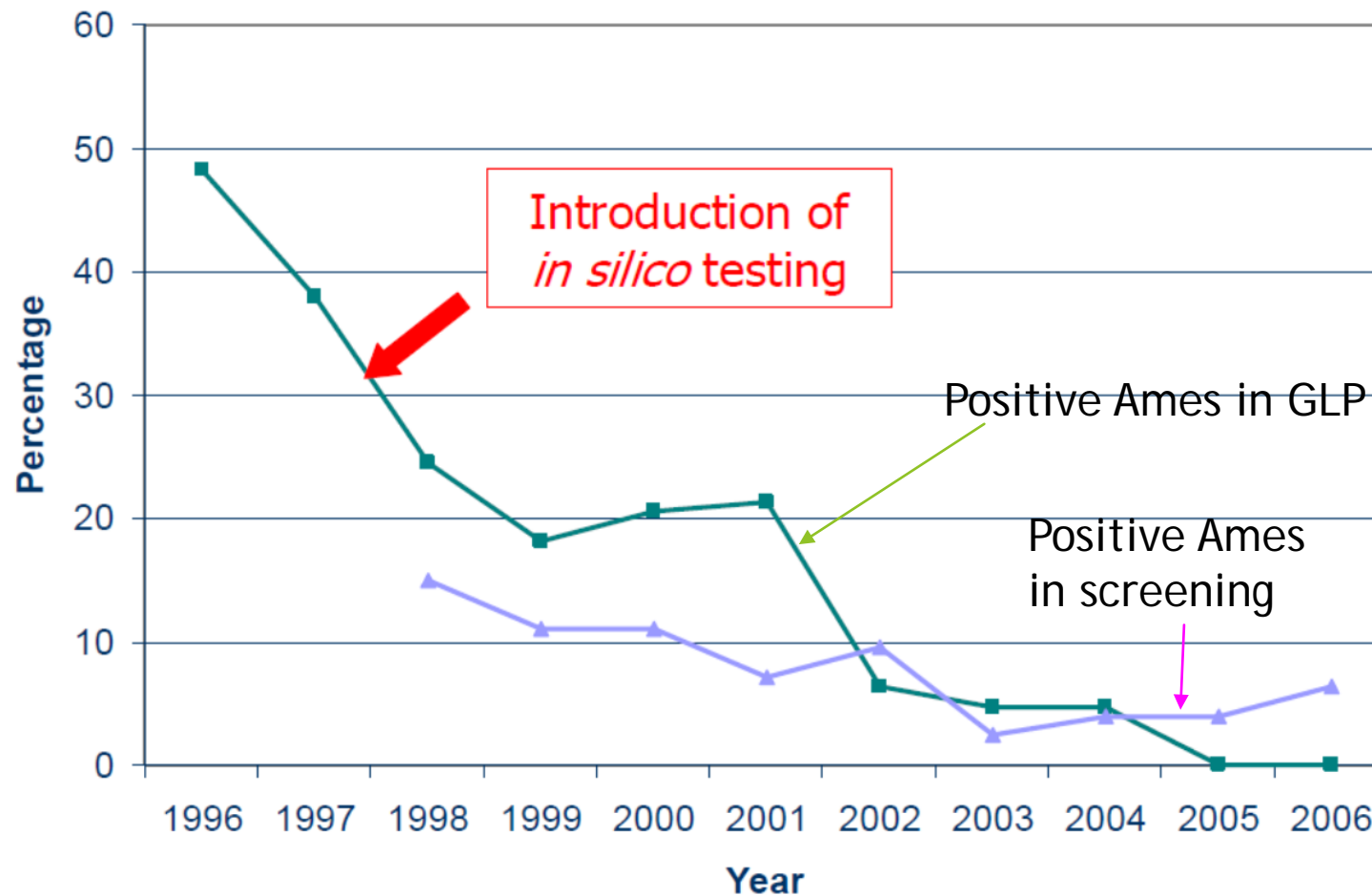
~omics



Pathways



In silico導入による候補化合物の脱落率 (R社)



何故今、遺伝毒性QSARなのか？

◆ 医薬品の遺伝毒性不純物のリスク評価と管理への利用

- ◆ QSARによる遺伝毒性性の評価と、TTCによる包括的管理
- ◆ ICH-M7ガイドライン化 (Step3)

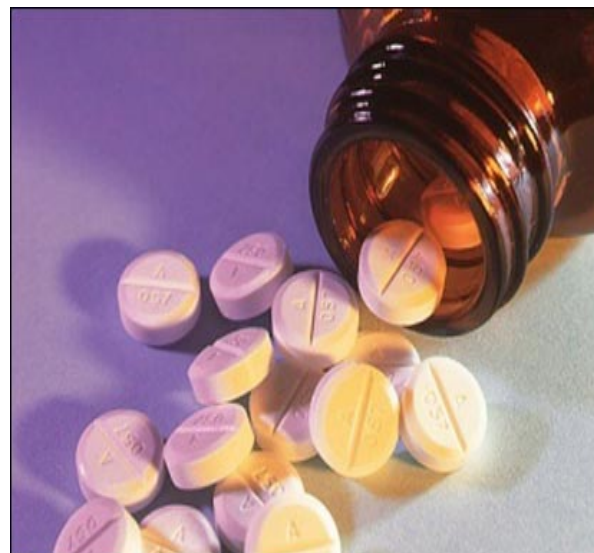
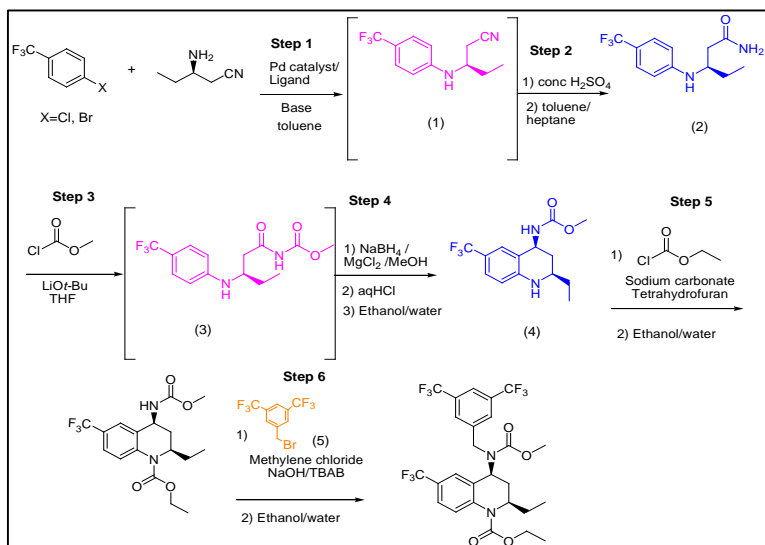
◆ 化学物質の安全性評価への利用

- ◆ スクリーニング評価
- ◆ 優先付け
- ◆ 動物愛護 (3R) の促進

◆ 香料の遺伝毒性評価

- ◆ 実際の試験が困難、もしくは不可能

医薬品中に含まれる遺伝毒性不純物とは？



合成過程の試薬、
反応中間体、副産物

医薬品の分解物

不純物

遺伝毒性？

医薬品の不純物に関するICH品質ガイドライン

- ◆ ICH Q3A: 原薬の不純物に関するガイドライン
- ◆ ICH Q3B: 製剤の不純物に関するガイドライン

	最大一日投与量	構造決定が必要な閾値	安全性確認が必要な閾値
原薬	≤2 g	0.10% 又は 1 mg/日の低い方	0.15% 又は 1 mgの低い方
	> 2 g	0.05%	0.05%
製剤	<1 mg	1.0% 又は 5 µg/日の低い方	
	1 mg ~ 10 mg	0.5% 又は 20 µg/日の低い方	
	10 mg ~ 2 g	0.2% 又は 2 mg/日の低い方	
	> 2 g	0.10%	
	<10 mg		1.0% 又は 50 µg/日の低い方
10 mg ~ 100mg		0.5% 又は 200 µg /日の低い方	
100 mg ~ 2 g		0.2% 又は 3 mg/日の低い方	
> 2 g		0.15%	

医薬品の不純物に関するICH品質ガイドライン Q3A/Bの問題点(1)

たとえば、Q3B（製剤）では

1日2gの製剤を服用し、その0.15%に遺伝毒性不純物が含まれるとしても許容される。



**最大3mg/dayの遺伝毒性物質を暴露
(0.06mg/kg/day:体重50kg)**

DMNは0.1mg/kg/dayでラットの50%にがんをつくる。

医薬品の不純物に関する ICH 品質ガイドライン Q3A/Bの問題点 (2)

7. 不純物の安全性の確認 (Q3A)

本ガイドラインは、臨床試験段階で使用する新原薬に適用することを意図したものではないが、本ガイドラインに示した閾値は、開発の後期の段階において実生産を反映した工程で製造された原薬ロット中に認められた新たな不純物を評価する上でも有用である。

ICH-M7: 潜在的発がんリスクを低減するための医薬品中DNA反応性 (変異原性) 不純物の評価および管理

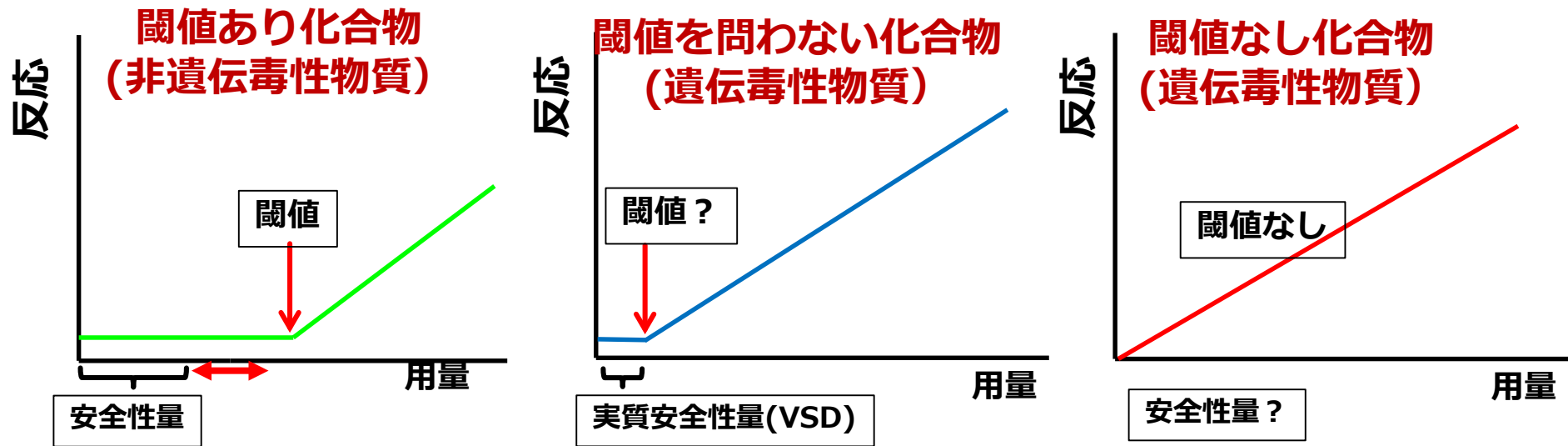


- ◆ ICH 運営委員会が遺伝毒性不純物に関するガイドラインの策定を承認 (2010年、6月)
- ◆ 専門家作業グループが組織され、ICH-M7ガイドライン策定作業が開始 (2010年、11月 福岡)
- ◆ Step2文書が完成(2012年、11月 サンディエゴ)
- ◆ パブコメ (~2013年、6月)
- ◆ Step4 (2013年、11月 大阪?)

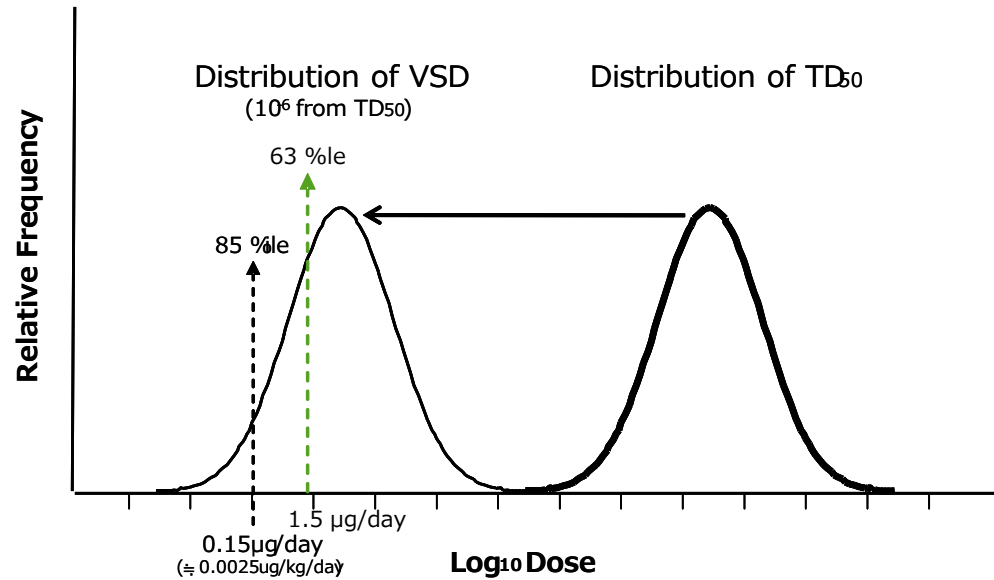
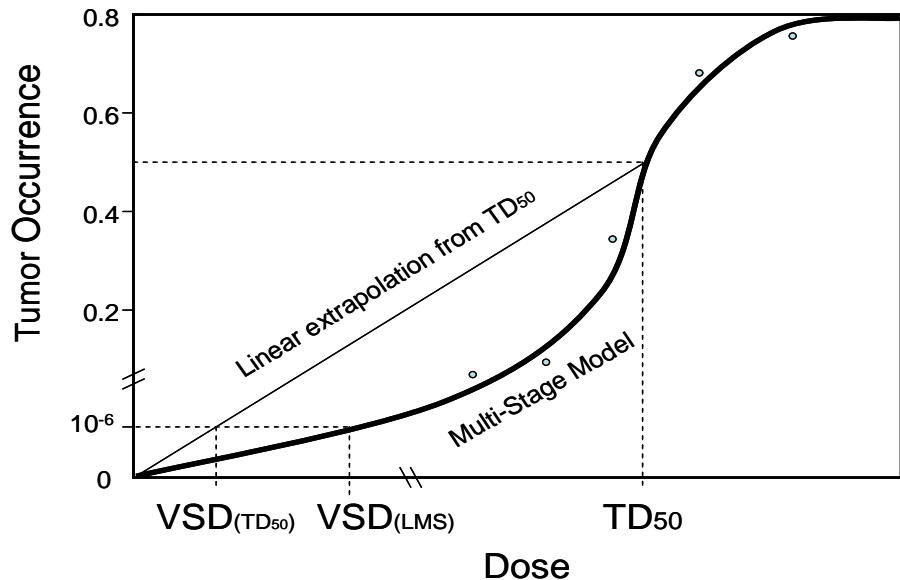
ICH-M7 ガイドラインの主なポイント

- 対象は低レベルでDNAに直接損傷を与える変異原物質(Mutagens)のみ
- 毒性学的懸念の閾値 (TTC)の適用
- 治験薬に関しても遺伝毒性不純物のリスク評価と管理を義務づける
- 構造活性相関 (SAR)によるin silico手法を用いて変異原性を評価する

遺伝毒性閾値とTTC



TTC算出の根拠



実際のリスク評価の際のユニットリスクの算定には、線形マルチステージモデルなどの数理モデルによるフィッティングを行って求められるが、TD₅₀からの直線外挿により、VSD (10⁻⁵~10⁻⁶リスク) を求め、その分布を解析。

発がん性が最も感受性の高い毒性エンドポイントであるという仮定に基づいて、発がん性データベース (Carcinogenic Potency Database: CPDB) から得られるTD₅₀データの分布解析から求められている。

$$\text{VSD with } 10^{-5} \text{ risk } (\mu\text{g/person/day}) = \text{Weight (kg)} \times \text{TD}_{50}(\mu\text{g/kg}) / 50,000$$

$$1.25 \text{ mg/kg/day (TD}_{50}) \rightarrow 1.5 \mu\text{g/day (VSD)}$$

毒性学的懸念の閾値 (Thresholds of Toxicological Concern ; TTC)

1.5 μ g/人/日

- 未知の化学物質の10%が発がん物質と仮定して、その99%が 10^{-5} の発がんリスクで担保される設定閾値

すべての化学物質について、その値以下では明らかな健康被害がないとするヒトでの包括的な実質安全性閾値 (Virtual Safety Dose; VSD)の設定について述べた概念。

不純物のハザード評価

I. 不純物の分類

II. 構造活性相関 (QSAR) 解析

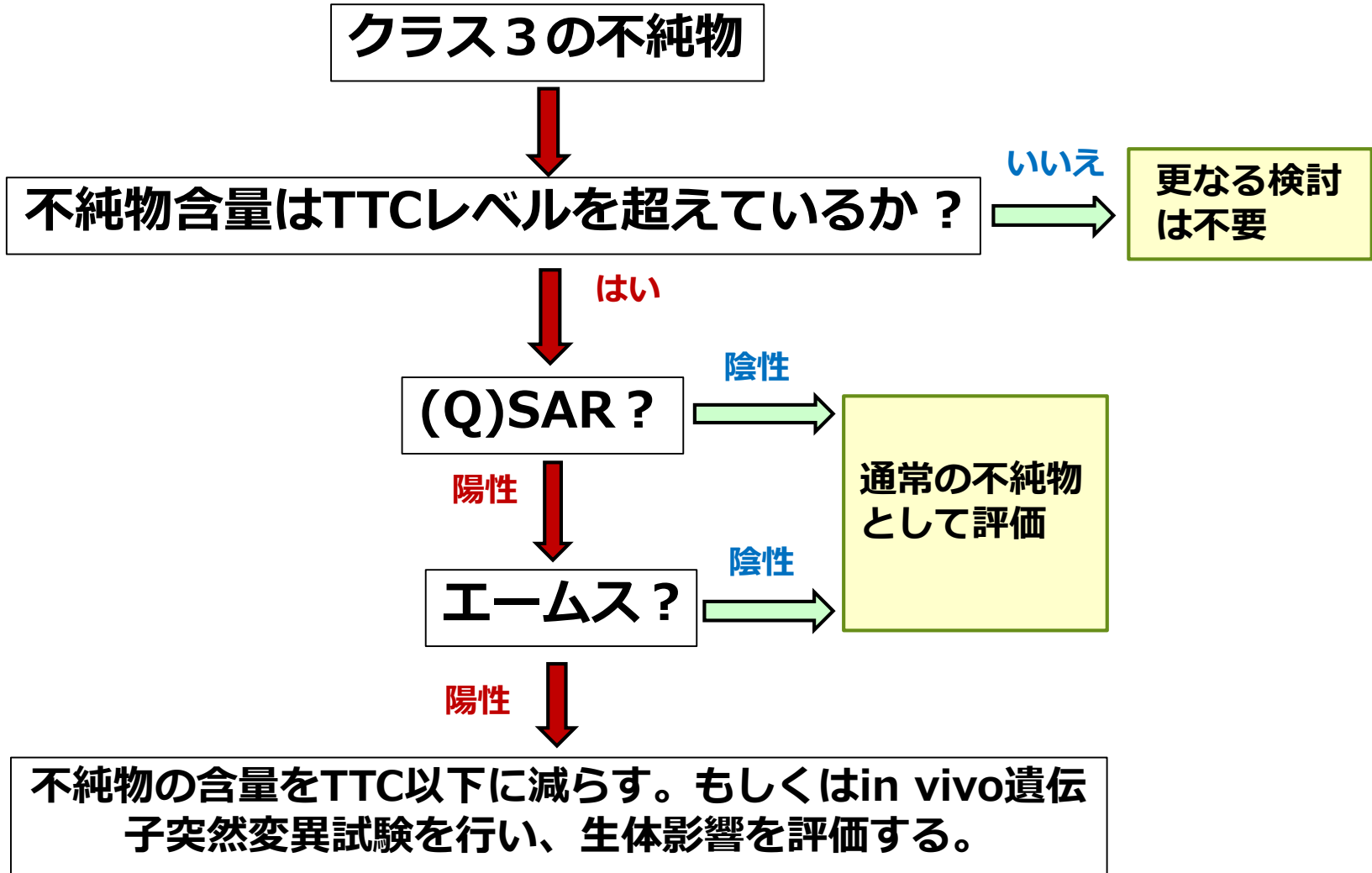
III. エームス試験

IV. In vivo 試験によるフォローアップ

遺伝毒性不純物の分類と管理方法

不純物分類	定義	予想される 管理方法
カテゴリー 1	既知の変異原性発がん物質	TCC or 他の方法
カテゴリー 2	変異原性を有するが発がん性不明	
カテゴリー 3	原薬の構造に関連しないアラート構造を有する。 変異原性データはない。	非変異原 物質とし て評価
カテゴリー 4	原薬と類似したアラート構造を有する。原薬の変異原性は試験データは陰性。	
カテゴリー 5	構造アラートの特徴なし	

DNA反応性不純物の安全性確認のためのフローチャート



構造活性相関 ((Q)SAR) 解析

互いに相補的な2種類の(Q)SAR予測モデルを用いるべきである。1つは専門的な経験に基づくルールベースの方法、2つ目は統計ベースの手法である。用いられる(Q)SARモデルはOECD原則に従い、バリデーションされるべきである。コンピュータシステムに基づいた解析の最終結果は、専門的知識を利用し判断されるべきである。これは、陽性か陰性かの予測結果を支持する追加の証拠を提供すること、および矛盾する結果が生じた場合の原因を理解することに重要である。

2つの相補的な(Q)SAR(ルールベース、統計ベース)により警告構造が無いことが指摘された場合は不純物に変異原性の懸念は無いと結論するのに十分であり、それ以上、試験は必要ない。

変異原性 (Q)SARツール (代表的なもの)

**Expert
RULE-
BASED**

DEREK, OncoLogic, HazardExpert, Toxtree, OECD Tool box
化合物の構造からその毒性を予測する知識ベース (Knowledge Base) のエキスパートシステム。多くの知見から得られた部分構造活性相関(SAR) の経験則をルール化した知識ベースにより、定性的毒性予測を行う。

Hybrid

OASIS/TIMES
化合物の構造からその毒性を予測する知識ベース (Knowledge Base) と統計を組み合わせたもの。代謝予測機能を持つ。アプリカブルドメインが制限される。

**Statistical
QSAR-
BASED**

Multi-Case, CASEULTRA
化学物質の構造と特徴を表す構造記述子と多数の部分構造 (Biophore) を機械的に検出し、ベイズ統計理論を用いて毒性に関与する構造記述子を選別し、毒性を予測する。

MDL-QSAR (SciQSAR), LSMA, TOPKAT, CASER (VEGA), LAZAR, AWORKS, Sarah

化学物質の構造を多数のパラメータ (数値データ) に変換し、毒性と相関性の高いパラメータを用い、多変量解析、パターン認識により毒性を予測する。

医薬品中変異原性不純物評価に推奨される(Q)SAR

EU

ii) Yes, the absence of a structural alert based on a well-performed assessment (e.g. through application of commonly used QSAR assessment software such as DEREK or MCASE) will be sufficient to conclude that the impurity is of no concern with respect to genotoxicity and no further 'qualification' studies or justification will be required.

USA

If an impurity that is present at levels below the ICH qualification thresholds is identified, the impurity should be evaluated for genotoxicity and carcinogenicity based on structural activity relationship (SAR) assessments (i.e., whether there is a *structural alert*). This evaluation can be conducted via a review of the available literature or through a computational toxicology assessment; commonly used software includes MDL-QSAR, MC4PC, and Derek for Windows.

ICH

A computational toxicology assessment should be performed using (Q)SAR methodologies that predict the outcome of a bacterial mutagenicity assay. Two (Q)SAR prediction methodologies that complement each other should be applied. One methodology should be expert rule-based and the second methodology should be statistical-based. (Q)SAR models utilizing these prediction methodologies should follow the validation principles set forth by the Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). (18)

Complement?

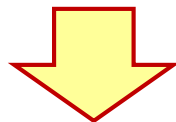
化学物質の安全性評価へのQSAR等の利用の背景

2002年 持続可能な開発に関する世界首脳会議(WSSD) ヨハネスブルグサミット

科学的根拠に基づくリスク評価・管理手順を用いて、化学物質がヒトの健康や環境にもたらす著しい悪影響を最小化する方法で使用・生産されることを2020年までに達成する。

2009年 改正化審法

- ハザード評価からリスク評価へ
- 既存化学物質を含む全ての化学物質（既存一般化学物質：約2万）のスクリーニング評価
- 優先評価化学物質の絞り込み



- ◆ (Q)SARの利用
- ◆ カテゴリーアプローチの利用

化学物質審査で利用されているQSAR

	評価対象	QSARツール
経済産業省	分解性	BIOWIN5 BIOWIN6 CATABOL
	生物濃縮性	BCFWIN CERIモデル Baseline Model
環境省	生態影響	TIMES ECOSAR KATE
厚生労働省	ヒト健康影響 (遺伝毒性：AMES)	DEREK Mcase AdWorks

国立衛研で化学物質の変異原性評価に利用している (Q)SARツール

- **DEREK**
- **Multi-Case(MCPC4)**
- **ADMEWorks**
- **TIMES-OASIS**

既存化学物質(206)の(Q)SARによるAmes試験予測

		DEREK			
		<i>In silico</i>			
		+	-	Total	
Ames	+	19	7	26	Sensitivity 73.1 %
	-	21	159	180	Specificity 88.3 %
		40	166	206	Concordance 86.4 %

Applicability: 100.0% (206/206)

Hayashi et al., *Mutat Res*, 588, 129-135 (2005)

		MCASE			
		<i>In silico</i>			
		+	-	Total	
Ames	+	13	7	20	Sensitivity 65.0 %
	-	13	133	146	Specificity 91.1 %
		40	140	166	Concordance 88.0 %

Applicability: 80.6% (166/206)

		AWORKS			
		<i>In silico</i>			
		+	-	Total	
Ames	+	19	7	26	Sensitivity 73.1 %
	-	54	124	178	Specificity 69.7 %
		73	131	204	Concordance 70.1 %

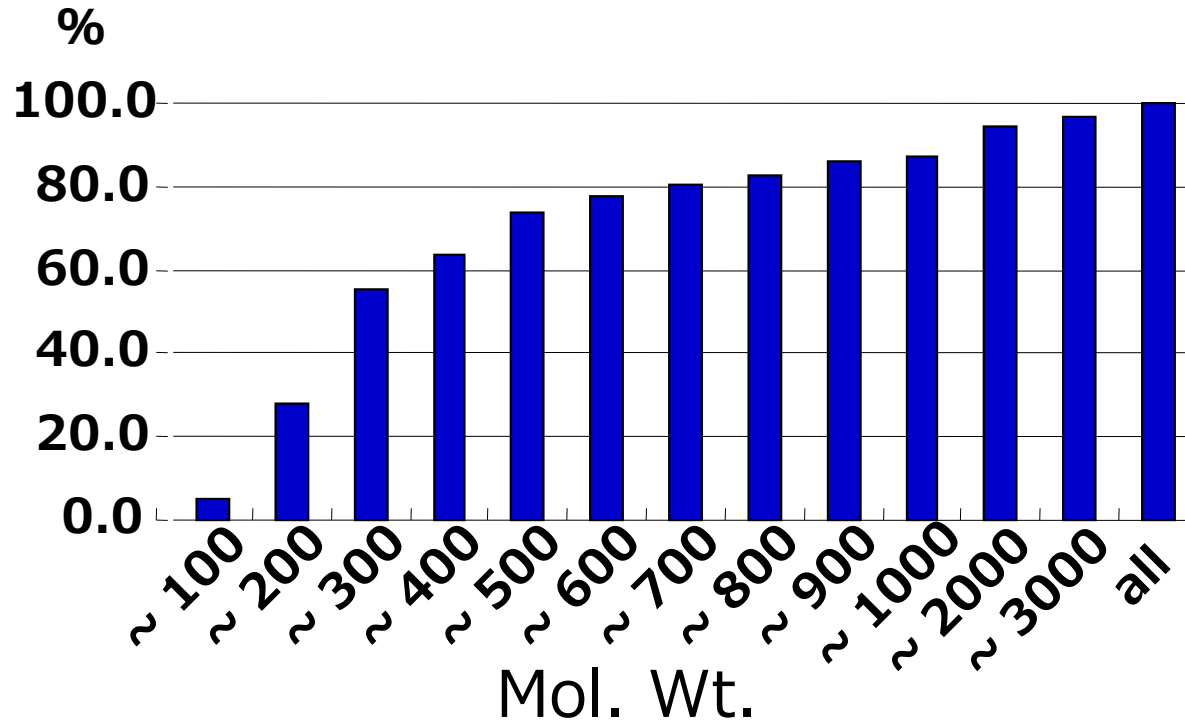
Applicability: 99.0% (204/206)

組合せによる評価

Combination 1									
	Positive				Negative				
DEREK	+	-	+	+	-	-	+	-	
MCASE	+	+	-	+	-	+	-	-	
AWORKS	+	+	+	-	+	-	-	-	

Combination 2									
	Pos.	Inconclusive						Neg.	
DEREK	+	-	+	+	-	-	+	-	
MCASE	+	+	-	+	-	+	-	-	
AWORKS	+	+	+	-	+	-	-	-	

分子量に対するエームス試験陽性物質の分布物



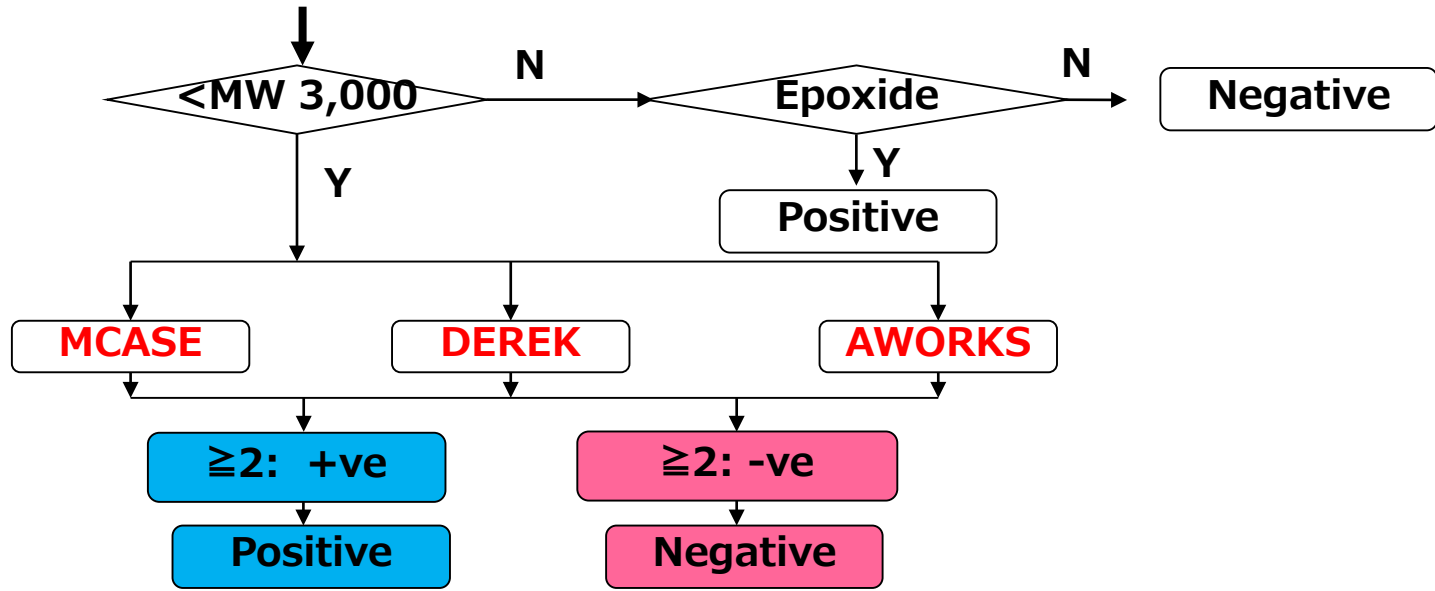
194化学物質

<1000 : 87.1 %

<3000 : 96.4 %

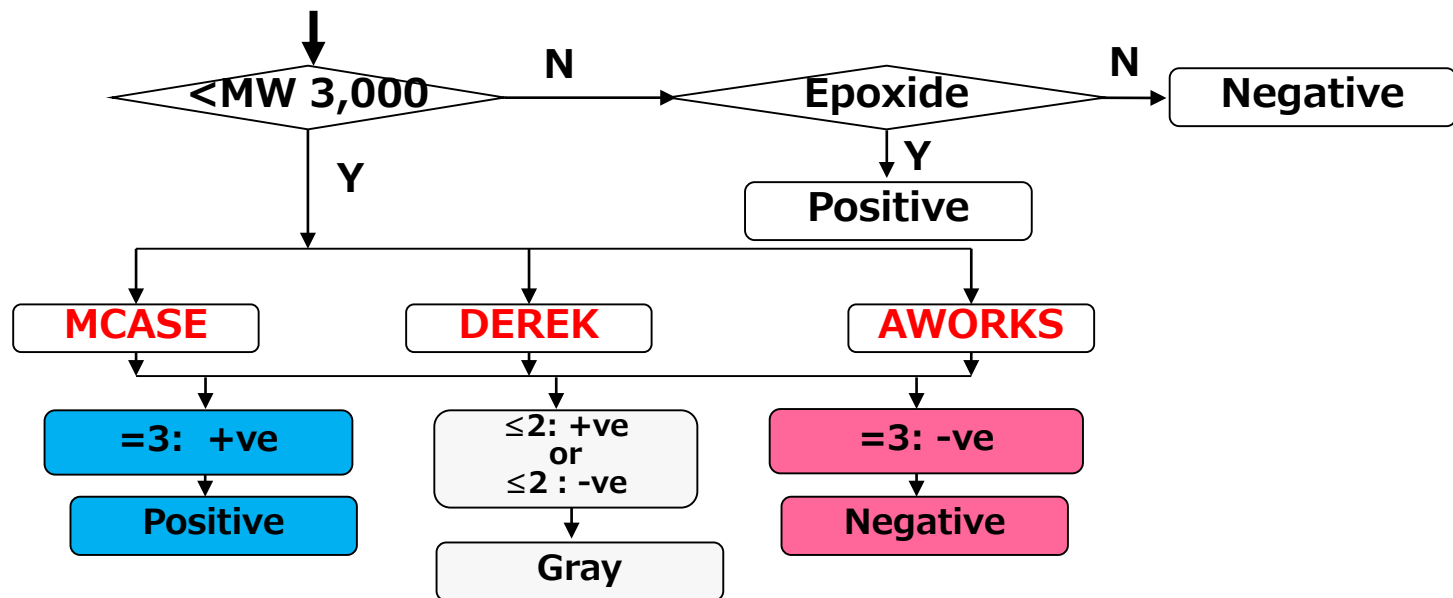
>3000 : 3.6% (4 of 7 : エポキシド)

決定樹 (Combination 1)



		In silico		Total	Sensitivity 73.1 %	Specificity 86.5 %	Applicability 95.1% (196/206)
		>++	>-				
Ames	+	19	7	26			
	-	23	147	170			
		42	154	196	Concordance 84.7 %		

決定樹 (Combination 2)



		In silico		Total	Sensitivity 86.7 %	Specificity 94.9 %	Applicability 55.3 % (114/206)
		+++	---				
Ames	+	13	2	15			
	-	5	94	99			
		18	96	114	Concordance 93.9 %		

DEREKとMCASEによるAMES陽性物質の検出力

		DEREK (%)	MCASE (%)
一般化学物質	Hayashi et al., Mutat Res, 588, 129-135 (2005)	73.1% (19/26)	65.0% (13/20)
医薬品	Snyder, Environ Mol Mutagen 50, 435 (2009)	61.5% (23/38)	44.7% (18/38)

4つの(Q)SARモデルのエームス試験結果の予測

Hillebrecht A et al., Comparative Evaluation of in Silico Systems for Ames Test Mutagenicity Prediction: Scope and Limitations., Chem Res Toxicol, 24, 843-853, 2011)

データソース	QSAR Type	QSAR Tool	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Concordance (%)
FDA (一般化学物質+医薬品) 4,699化合物 (44%陽性)	知識	DEREK Toxtree	71.7 78.0	78.1 70.0	75.4 73.5
	統計	Mcase LSMA	65.2 69.2	82.9 77.8	71.5 74.0
ハンセン (一般化学物質) 2,647化合物 (67%陽性)	知識	DEREK Toxtree	80.9 85.2	59.1 53.1	73.7 74.6
	統計	Mcase LSMA	74.6 67.8	74.0 63.8	74.4 66.4
ロッシュ(医薬) 2,335化合物 (13%陽性)	知識	DEREK Toxtree	43.4 42.9	91.6 77.5	85.5 73.1
	統計	Mcase LSMA	30.6 17.4	85.8 93.9	78.9 83.6

知識ベース、統計ベースの2つの(Q)SARモデルによるエームス陽性物質の検出力

Sutter et al., Use of in silico system and expert knowledge for structure-based assessment of potentially mutagenic impurities. Regul. Tox. Pharma., 2013 (PhARMA White paper)

企業	QSAR Tools	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Concordance (%)
A社 608化合物 (25%陽性)	DEREK	44	78	69
	+Mcase	83	47	56
B社 269化合物 (14%陽性)	DEREK	72	70	70
	+Mcase	77	69	67
	+LSMA	77	69	69
C社 119化合物 (31%陽性)	DEREK	97	6	34
	+Mcase	100	2	33

香料の変異原性評価

Food and Chemical Toxicology 50 (2012) 1538–1546

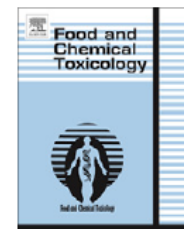


ELSEVIER

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Food and Chemical Toxicology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchemtox



Validation of the (Q)SAR combination approach for mutagenicity prediction of flavor chemicals

Atsushi Ono^a, Mika Takahashi^a, Akihiko Hirose^{a,*}, Eiichi Kamata^a, Tomoko Kawamura^a, Takeshi Yamazaki^b, Kyoko Sato^b, Masami Yamada^c, Takayuki Fukumoto^d, Hiroyuki Okamura^d, Yoshiharu Mirokuji^d, Masamitsu Honma^c

^a Division of Risk Assessment, National Institute of Health Sciences, Tokyo 158-8501, Japan

^b Division of Food Additives, National Institute of Health Sciences, Tokyo 158-8501, Japan

^c Division of Genetics and Mutagenesis, National Institute of Health Sciences, Tokyo 158-8501, Japan

^d Japan Flavor and Fragrance Materials Association, Tokyo 103-0023, Japan

エームス試験以外の遺伝毒性QSAR

■ *In vitro*染色体異常試験の予測

- DEREK
- MCASE
- AWORKS
- TIMES

■ *In vivo*遺伝毒性試験の予測



動物代替試験

- DEREK
- TIMES

OASIS/TIMESによる in vivo 遺伝毒性の予測

dmdadmin | MPSJCA | JCA10.0.1408/W Unicode | tx-2011-00547s3d (R2.1.1s HF03:2984 | 2.0 alpha 39) 2011/12/22 17:29 | PROD-JCA1 | rq_57278 | 1/12/2012 04:09:16 | 20

**Chemical
Research in
Toxicology**

Article

pubs.acs.org/crt

1 Investigating the Relationship between in Vitro–in Vivo 2 Genotoxicity: Derivation of Mechanistic QSAR Models for in Vivo 3 Liver Genotoxicity and in Vivo Bone Marrow Micronucleus Formation 4 Which Encompass Metabolism

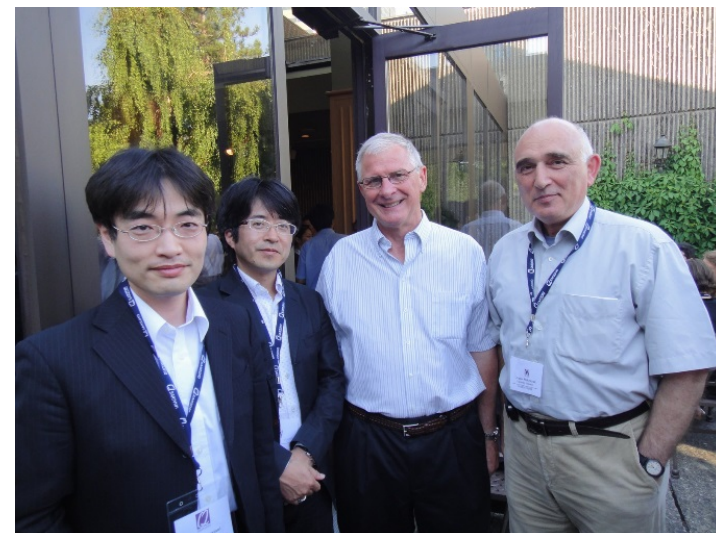
5 Ovanes G. Mekenyan,[†] Petko I. Petkov,[†] Stefan V. Kotov,[†] Stoyanka Stoeva,[†] Verginia B. Kamenska,[†]
6 Sabcho D. Dimitrov,[†] Masamitsu Honma,[‡] Makoto Hayashi,[‡] Romualdo Benigni,[§] E. Maria Donner,^{||}
7 and Grace Patlewicz^{*||}

8 [†]Laboratory of Mathematical Chemistry (LMC), As. Zlatarov University, Bourgas, Bulgaria

9 [‡]Division of Genetics and Mutagenesis, National Institute of Health Sciences, Tokyo, Japan

10 [§]Environment and Health Department, Istituto Superiore di Sanita', Rome, Italy

11 ^{||}DuPont Haskell Global Centers for Health and Environmental Sciences, Newark, Delaware 19714-0050, United States



まとめ

- 遺伝毒性試験の目的はがん原生のスクリーニングであるが、その予測率は高くない。また、動物代替の流れからin vivo試験は制限される方向にある。
- 変異原性（エームス試験結果）に関する(Q)SARツールは数多く研究、開発されており、他の毒性の予測よりその精度は高い。
- 医薬品不純物の変異原性の評価に(Q)SARを用いることが国際ガイドライン(ICH-M7)に組み入れられた。この流れは(Q)SARの利用、研究の追い風となる。