

資料

ライフサイエンスのためのアイソトープ測定機器(第四シリーズ)

Ⅶ. 加速器質量分析(AMS)の医薬品開発への応用 ——探索段階におけるヒトマスバランス試験——

宮岡貞次

Reprinted from
RADIOISOTOPES, Vol.54, No.2
February 2005



Japan Radioisotope Association

<http://www.jrias.or.jp/>

資 料



ライフサイエンスのためのアイソトープ測定機器 (第四シリーズ)

 VII. 加速器質量分析 (AMS) の医薬品開発への応用
 ——探索段階におけるヒトマスバランス試験——†

宮岡貞次

 第一化学薬品株式会社 薬物動態研究所
 103-0027 東京都中央区日本橋 3-13-5 日本橋 313 ビル

 Key Words : pharmaceutical development, clinical screening study, accelerator mass spectrometry,
 mass balance study, microdosing, carbon-14

1. はじめに

最近、欧米では医薬品開発の探索段階 (スクリーニング段階) でヒトにおける薬物動態試験を実施し、それに基づき開発候補品を絞り込む方策が規制当局より提案されている。1997年、米国 FDA は、単回投与の臨床試験であれば、反復投与毒性試験を必要としない拡張型単回投与毒性試験により認可する規制緩和を実施した¹⁾。しかし、この運用に問題が生じたためスクリーニングを目的とした Phase 1 試験の認可は間もなく中止された²⁾。2003年 EU は、「単回 Micro Dose 臨床試験に必要な非臨床安全性試験に関する Position Paper」を布告し、低用量、単回投与に限定したスクリーニング目的の Phase 1 試験*を公認した³⁾。

このような規制当局の動向の背景には、最近の新薬開発にゲノム創薬関連手法が導入され新

規医薬品候補化合物の数が大幅に増えたにもかかわらず、承認申請品目が増加しない現実がある。米国では、1996年から2001年の5年間に研究開発費は約40%増加したが、新薬承認数は約50%減少している⁴⁾。新規候補化合物が増加するにもかかわらず承認申請品目がそれに連動しない原因は、開発段階で中止に追い込まれる候補化合物が多いからである。

日本製薬工業会編集の DATA BOOK 2000⁵⁾によれば、米国では候補化合物のうち臨床試験段階へ進む確率は、約10000分の1である。非臨床試験段階から臨床試験段階へ進む確率は、約50分の1で、臨床試験段階から新薬承認までの確率は、約5分の1である。臨床試験段階での開発中止は、45~72%がPhase 1 試験段階で起こり、この中止の理由の主なもの、薬物動態に基づくものである。したがって、Phase 1 段階での中止か継続かの判断には、薬物動態データが重要な役割を担っていると言わざるを得ない⁶⁾。

† Instruments for Radiation Measurement in Life Sciences(4). VII. Application of Accelerator Mass Spectrometry for Drug Development —— Human Mass Balance Studies at Discovery Stage ——.
 Teiji MIYAOKA : ADME/TOX Research Institute, Daiichi Pure Chemicals Co, Ltd., 3-13-5, Nihombashi, Chuo-ku, Tokyo 103-0027, Japan.

*Phase 1 試験 : RI 標識した薬物 (Hot, ¹⁴C 化合物) を用いた Phase 1 試験をヒト Hot 試験と定義する。非 RI 標識化合物 (Cold) を用いた Phase 1 試験をヒト Cold 試験と定義する。

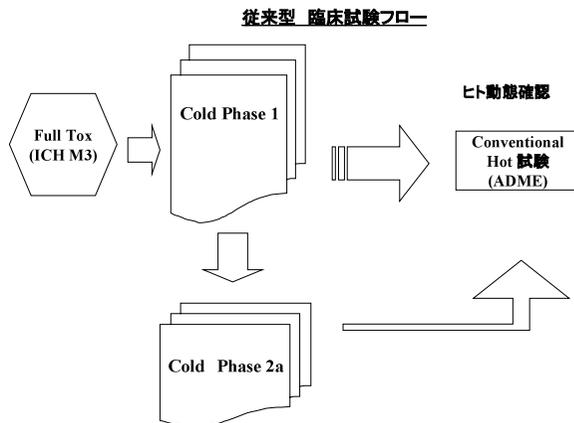


図1 Conventional Hot 試験の実施タイミング

EU EMEA (The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products) より提案された Position Paper では、スクリーニングを目的として放射性物質 (RI) を標識した薬物 (Hot 化合物) を用い加速器質量分析法 (Accelerator Mass Spectrometry, AMS) やポジトロン断層撮影法 (Positron Emission Tomography, PET) による超高感度分析を推奨している。ここでは、探索段階におけるスクリーニングを目的としたヒト Hot 試験を検証し、開発初期におけるヒト動態試験の意義について考察する。

2. 従来型開発におけるヒト Hot 試験**

従来から実施されている医薬品開発のメニューは、International Conference on Harmonization (ICH) にて定められた定型の非臨床試験 (ICH Topic M3) に始まり、Cold 化合物 (非 RI 標識化合物) を用いた Phase 1 試験、その結果を踏まえた Phase 2a 試験へと進める。

一方、Conventional Hot 試験は、Phase 2a 以

降に実施することが従来多く試みられていた。すなわち、患者での薬効が明らかとなった後、ヒトでのマスバランスデータや代謝物 Profile を確認することを主眼としたものであり、Hot 試験データを利用した開発展開を目指したものではなかった。この場合、Phase 2a 以降でヒト特有の代謝物が判明し、この代謝物の毒性を再検討しなければならない事態も発生した (図1)。このような事情を反映して、Phase 1 試験後のできるだけ早い時点で Conventional Hot 試験を実施し、薬物動態データを取得することが試みられてきている。

Cold の Phase 1 試験 から Pharmacokinetic (以下 PK と略す) データ、安全性データ等入手し、Conventional Hot 試験からマスバランスデータや代謝物 Profile データを入手することにより、動物で取得済の毒性データ、Toxicokinetic・ADME データ、代謝物データと比較し、動物とヒトでの種差の検討や動物で予想される薬物の作用機序のヒトへの外挿が可能となる。動物からヒトまでの一貫したデータに基づき開発計画を検証することが実施されつつある。

3. 開発初期における Micro Dose Hot 試験

2003 年 1 月に提案された EU, EMEA の Committee for Proprietary Medicinal Products

**ヒト Hot 試験：臨床投与量に基づき Micro Dose (100 μ g 以下) 投与の Phase 1 試験 (14 C 投与量数十 nCi/Body) を Micro Dose Hot 試験及び Conventional Dose (臨床用量に近い用量) 投与の Phase 1 試験 (14 C 投与量 約 50 μ Ci/Body) を Conventional Hot 試験と定義する。

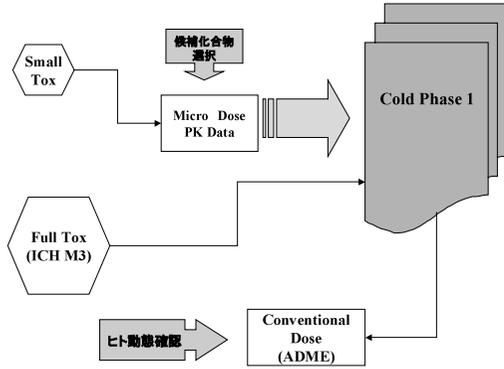


図2 探索段階における Micro Dose ヒト Hot 試験

(CPMP) による Position Paper³⁾によると Micro Dose Hot試験は、以下のようにまとめられる。

- ・ 目的 - 探索段階にある候補化合物あるいは剤型の選択
- ・ 被験物質数 - 1種又は複数
- ・ 投与量 - 予想薬効用量の 1/100 以下及び 100 μg 以下
- ・ 投与 - 単回投与
- ・ 被験物質 - 非標識及び標識化合物
- ・ 分析法 - AMS, PET 又は LC/MS/MS

この臨床試験は、予備的な Phase 1 試験として位置づけられているため、最小限の非臨床試験で、投与用量を 100 μg 以下に抑えることにより被験者の安全性を確保している。このよう

な規定により、探索段階における医薬品開発の促進、あるいはより有効な開発提案を行っている(図2)。この政策は、1996年に米国FDAが提案したスクリーニング試験の結果を踏まえ、EUにおける臨床試験市場確保に向けた米国に対抗した戦略的な色合いを強く出している。

Micro Dose Hot 試験の Protocol は、対応化合物、委託者事情によるがおおよその Protocol 案と Conventional Hot 試験とを比較すると表1のようになる。

4. Micro Dose Hot 試験の目的

候補化合物の選択では、薬物動態特性が悪いものを排除して、良いものを拾い上げ次の開発ステージへ進ませることを目的とする。したがって、薬物の未変化体血中濃度が上がらないとか上がり方が遅いものを確認することが要求される。また、この血漿、尿、糞試料を用い AMS で分析することによりマスバランスデータや代謝物情報を入手することも可能である。候補化合物 (Cold Phase 1 試験以前) 段階でこの取捨選択ができる。

Micro Dose Hot 試験における問題点・疑問点は、投与量が 100 μg 以下の微量である事である。このような低用量での PK データが臨床用量にまで外挿可能なのかという疑問がある。経口剤において溶解速度が律速となることが明らかでない場合や First-Pass の代謝が飽和を受ける

表1 Micro Dose 及び Conventional Dose Hot 試験 - Outline Protocol

種類	Cold/Hot Compound	投与量/用量	Outline	分析法
Micro Dose	Cold: <100 μg Hot: 0.001 MBq (0.03 μCi)	<100 μg 単回 IV & PO	2-4 Male 2-7 Day Plasma PK (Metabolite Profile)	AMS (LC/MS/MS)
Conventional Dose	Cold: Clinical Dose Hot: 2 MBq (50 μCi)	Clinical Dose 単回 IV or PO	6 Male 7 Day Plasma, Urine, Feces Total Activity Metabolite Profile	LSC LC/MS/MS

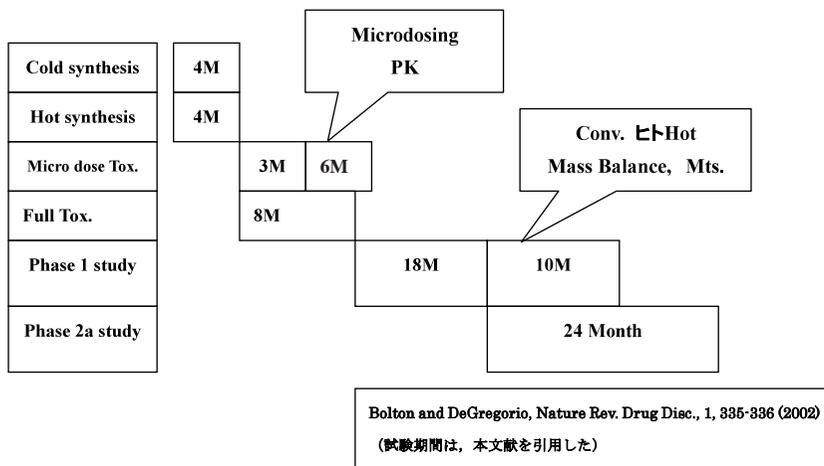


図3 ヒト Hot 試験－薬物動態データの入手タイミング

ような場合は、本試験は適切ではないとの意見もある。また、その薬物の動態にトランスポーターや、Protein Binding が関わる場合の外挿も注意を払うべきである。

種々の論議が交わされている現状であるが、ヒトの薬物動態情報（PK データ、マスバランスデータ）を探索段階において入手できることは、開発の最終目標であるヒトでの薬効や安全性を裏付ける基礎データを確認できる点で大変意義深い。Micro Dose Hot 試験と Conventional Hot 試験を実施した場合、開発上の時間にどのような差が生まれるかを試算し、それらがその後の開発にどのような影響を及ぼすかを予想してみた（図3）。各試験に要する時間は、極め

てラフな予想に基づくものであるが、Micro Dose と Conventional Dose の試験を比較する範囲では、十分なものと思われる。Micro Dose Hot 試験は、非臨床試験（図3）3か月、臨床試験データ入手（AMS 分析を含む）6か月を要し、データ入手には全体でおおよそ9か月の時間を必要とする（臨床試験データは、より早く入手可能）。一方、Conventional Hot 試験は非臨床試験（図3）8か月、Cold Phase 1 試験18か月を要した後 Conventional Hot 試験に10か月を必要とする。全体でおおよそ36か月が必要となる。必要時間の差は、4倍（約2.3年）で歴然としており Cold Phase 1 試験前に基本的な動態試験データを入手できる意義は大きい。

表2 Micro Dose ヒト Hot 試験－要求される非臨床試験データ

種類	非臨床/臨床 Data	Hot Data
Micro Dose	Genotoxicity (GLP) Extended Single Dose Toxicity (14 Day, Histopathology) In vitro Metabolism	Dosimetry •Tissue Distr./ Excretion (albino rat)
Conventional Dose	Genotoxicity (GLP, ICH M3) Safety Pharmacology Single Dose Toxicity Repeated Dose Toxicity Cold Phase 1	ADME Data Dosimetry •Tissue Distr./ Excretion (albino rat) •Tissue Distr./Pigmented animal (rat)

5. Micro Dose Hot 試験の実施に要求される非臨床試験データ

Micro Dose 及び Conventional Dose Hot 試験の実施のために必要な非臨床試験データの概要を表2にまとめた。Micro Dose Hot 試験のための非臨床試験は、以下のようにまとめられる。

拡張型単回投与毒性試験：(GLP 試験)

- ・動物種－哺乳類1種
- ・群数－対照群 1群及び最小毒性発現用量を含む十分な用量群
- ・用量－予想薬効量の1/100以下及び100 µg以下
- ・動物数－雌雄 信頼性が確保できる十分な数
- ・投与経路－静脈内投与と臨床予定経路
- ・試験期間－14日。2日目に中間屠殺
- ・剖検－切迫屠殺動物、死亡動物、2及び14日の期間終了動物。全動物
- ・血液、血液生化学的検査、病理組織学的検査－2及び14日の最小2回
- ・その他－入手可能な背景情報

遺伝毒性試験：(GLP 試験)

- ・In vitro 突然変異試験 (Ames 試験)
- ・In vitro 培養細胞を用いた染色体異常試験

代謝試験：In vitro 代謝試験

Hot 化合物に関わる試験：

- ・アルビノラットを用いた分布・排泄試験 (本試験を要求する Contract Research Organization (CRO) もある)

2004年5月より EU Directive⁷⁾が発効しこの新レギュレーションに基づいた Documentation が要求されることとなった。例えば、英国の CRO の Inveresk 社が Micro Dose Hot 試験を実施する際作成する資料は以下のとおりである。

- ・Regulatory Management

- ・Data review and risk assessment
 - Quality-Chemistry, Manufacture and Control
 - Safety-Pharmacotoxicology
 - Efficacy-Clinical experience
- ・Clinical Trial Application (CTA) administration
- ・Investigational Medicinal Product Dossier (IMPD)
- ・Ethics Committee Application
- ・Post-submission support
- ・Investigator's Brochure

これらの書面のうち委託者側で作成する必要がある書面は、Investigator's Brochure のみである。その他は、委託者より情報提供さえすれば、原則 Inveresk 社がその書面作成をする。

また、この新規のレギュレーションは、試験に使用される化合物の規格について次のように記載している。IMP (Investigational Medicinal Product) の製造時は、GMP (Good Manufacturing Practice) 規格が要求されると記している。この IMP の定義は、以下となっている。

Definition of IMP: "a pharmaceutical form of an active substance being tested or used as a reference in a clinical trial"

この"Pharmaceutical Form"とは、最終市販品の形態と理解される。したがって、Micro Dose Hot 試験に使用する Hot 及び Cold 化合物は、Non-GMP レベルの化合物で良いと理解される。これらの Hot 及び Cold 化合物の分析証明書及びその分析方法に関わる書面は要求される。

また、GMP レギュレーションが要求されている項目として、いわゆる"Formulation"がある。Micro Dose Hot 試験の場合、Hot と Cold 化合物を製剤化 (カプセル化、静脈内投与剤型調整、経口投与液調整等)するプロセスは、GMP のレギュレーション下で実施することが義務づけられ、その為のライセンスが必要である。この Formulation プロセスは、臨床試験実施側 (例えば、Inveresk 社) の責任で行うため、試

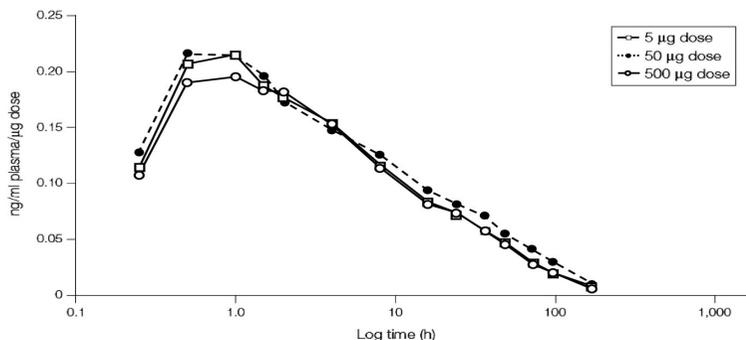


図 4 5, 50, 500 μg 経口投与におけるヒト血漿中薬物濃度の Semi-log Plot
各投与量は、一定量の標識化合物 50 nCi を添加した。各プロットは、直線的な用量相関を示している(文献 8 より引用。但し各用量の記号及びラインのみ変更した)

験委託者はそれを確認するのみでよい。

6. 極微量の RI を用いたヒト Hot 試験の実施例

^{14}C ラベルした α_{1A} -adrenoreceptor antagonist (^{14}C -ARA) を 6 名の男性ボランティアにクロスオーバーで経口投与した^{8),9)}。 ^{14}C -ARA (50 nCi あるいは 1.85 kBq/body/dose) を含む ARA をそれぞれ 5, 50, 500 μg /body (500 μg は、薬効用量) 投与した。血漿及び尿を投与後 168 時間まで採取した。血漿中 ^{14}C は除蛋白後 AMS で測定した。また、血漿を HPLC にて分画し

たフラクションも AMS で測定した。500 μg 投与群は、LC/MS/MS にて Cold 分析も実施した。

3 用量の log-linear plot (図 4) は、用量相関を示した。AMS と LC/MS/MS により算出した PK パラメーターの比較では、 C_{max} 及び $\text{AUC}_{0-\text{inf}}$ が AMS で 30% 高くなったが、平均の半減期は良く一致した。AMS による C_{max} 及び $\text{AUC}_{0-\text{inf}}$ 値は用量に比例していた。血漿中の代謝プロファイルを AMS により求めた (図 5)。

抗がん活性を有する ^{14}C ラベルした farnesyl

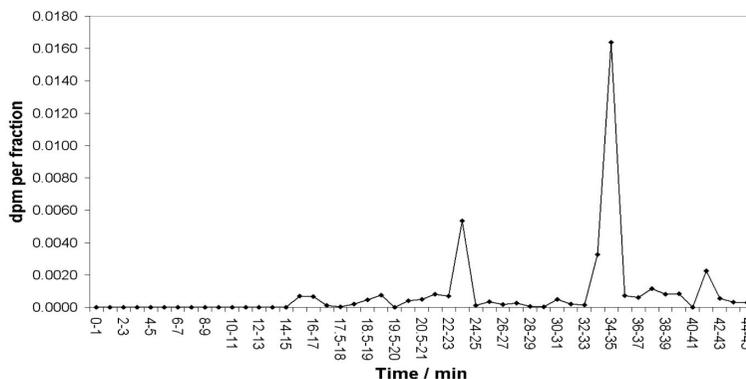


図 5 血漿中代謝物プロファイルの AMS 分析例 (文献 9 より引用)
0.02 dpm をカラムにインジェクションし分離後、AMS 分析を実施

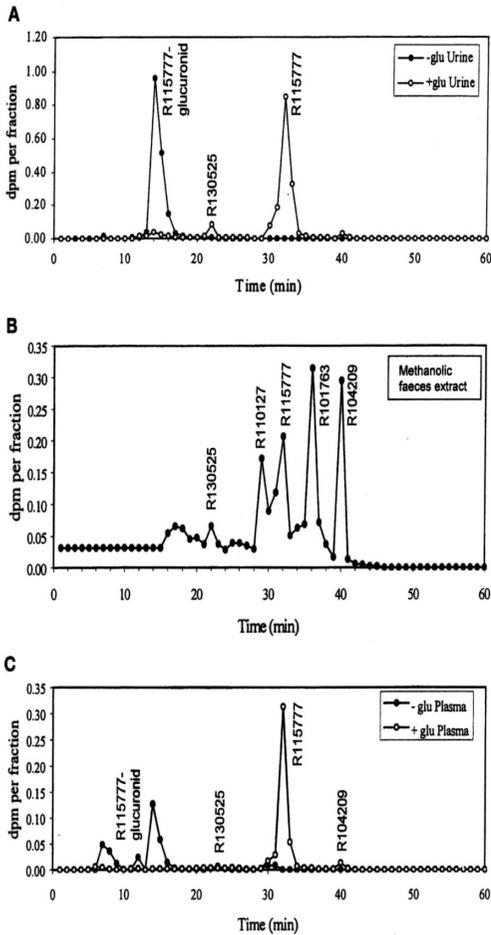


図6 AMS分析によるHPLC代謝物プロファイル
(文献10より引用)

A：尿 β -glucuronidase 処理分析

B：糞 MeOH 抽出液分析

C：血漿 β -glucuronidase 処理分析

transferase阻害薬 ^{14}C -labeled (B)-6-[amino(4-chlorophenyl)(1-methyl-1H-imidazol-5-yl)methyl]-4-(3-chlorophenyl)-1-methyl-2(1H)-quinolinone (^{14}C -R115777) を4名の男性ボランティアに経口投与し、そのマスバランス及び代謝プロファイルを検討した¹⁰。 ^{14}C -R115777 (50 nCi/body/dose, 25.4 Bq/mg あるいは 687 pCi/mg) を含む R115777 50 mg/body を投与した。血漿、尿、糞を定められた時間に採取した。 ^{14}C -R115777

は、主に尿、糞中に排泄されそれぞれの平均回収率は、糞が $79.8 \pm 12.9\%$ 、尿が $13.7 \pm 6.2\%$ であった。AMS と LC/MS/MS 測定で得られた血漿、尿、糞の代謝プロファイルの比較は、良い相関が得られた(図6)。

喘息、鼻炎治療薬として使用されている Fluticasone propionate (GI1817771) を ^{14}C ラベルした ^{14}C -GI1817771 (121Bq (3.3nCi)/body/dose) を含む GI1817771 2.7 mg/body を6名の男性ボランティアに経口投与し、マスバランスを調べた¹¹。糞中に99%以上が回収された。HPLCで分画後、代謝物プロファイルも検索した。

^{14}C ラベルしたNew Molecular Entity (50nCi/body) を4名の男性ボランティアに経口投与し、そのマスバランス及び代謝物プロファイルを検討した¹²。尿中排泄は、5%以下であった。血漿及び糞中の代謝物 Profile を HPLC 分離後、液体シンチレーションカウンタ及び AMS で調べた。 C_{\max} の平均濃度は、2 dpm/mL で120時間後に C_{\max} の1/10の濃度となった。

7. おわりに

従来 RI 標識化合物を用いたヒト動態試験は、Phase 1 あるいは 2a の臨床試験以降に実施していたが、AMS や PET などの RI の超高感度分析機器の発達により医薬品開発の探索段階においてヒト動態情報を入手できるようになった。Micro Dose Hot 試験が EU 当局により提案されている。EU 当局は、探索段階での候補化合物の選択の為、PK データを入手し化合物の選択に役立てることを主目的としているが、極微量の RI 化合物 (約 50 nCi/Body レベル) を用いたとしてもマスバランスや代謝物のプロファイルを検討することは可能である。極めて小規模の非臨床試験により探索段階でのヒトの PK データやマスバランスあるいは代謝プロファイルデータが入手できることが Micro Dose Hot 試験の最大の魅力である。

Micro Dose による微量の投与量 (100 μg 以下) でのヒト動態の評価に疑問を抱く場合、そ

の投与量を臨床用量近くまで上げ極微量の RI を投与する試験も可能である。いわば Micro Dose と Cold Phase 1 試験の中間的な試験で Cold Phase 1 試験前に実施し、開発の是非をより正確に判断するような考え方もある。探索段階でのヒト動態データを開発ステージにどのように活用するかは、各社の開発ポリシーによるところが大きいですが、少なくともヒト動態データをどの開発段階で取り、どのように開発に活かすかの選択肢は広がり、時間と費用を睨んだより効率的な開発計画が可能となりつつある。

一方、国内におけるヒト動態試験の実施に関する論議は、薬物動態学会を中心としてかなり深まりつつあるが、その進捗は期待を満足させるレベルではない¹³⁾。現状国内でのヒト Hot 試験の実施が不可能な状況であるため、その実施には海外 CRO を利用せざるを得ない。

弊社は、これまで英国の CRO である Inverek Research との業務提携によりヒト Hot 試験を実施してきた経験を活かし Micro Dose Hot 試験においても同様に実施できる。また、AMS 測定においては、加速器分析研究所（福島県白河市）と提携し AMS 測定をする体制を確立している。これらにより Micro Dose Hot 試験を含むヒト Hot 試験及びその代謝物分析試験や RI 化合物合成等についてより良いサービスを提供することが可能となっている。

EU, 米国を中心とした大手製薬企業は、Micro Dose Hot 試験を実施しつつあるが昨年度からその実施スピードが相当上がっているとの情報も入って来ている。本試験の本格的な有用性あるいは問題点の検証は、これからの実施例を待つ必要があるが、ヒトデータをより早くより効率的に入手するニーズは強くなるばかりである。

謝 辞

本稿を作成するにあたりご助言とご指導を頂いたオフィス野口 NGCA 代表 野口英世氏(加速器分析研究所 最高顧問)及び三菱ウエルファ

ーマ 薬物動態研究所 主任研究員 山田一磨 呂氏に深謝します。

文 献

- 1) Single dose acute toxicity testing for pharmaceuticals. Revised guidance. Availability, Notice, *Federal Register*, **Aug.26**, 43933-43935 (1996)
- 2) 馬屋原 宏, Screening Phase 1 試験と FDA 型単回投与試験, *薬物動態*, **14**, 243-259 (1999)
- 3) Position paper on the non-clinical safety studies to support clinical trials with a single microdose. The European Agency for Evaluation for Medical Products Evaluation of Medicines for Human Use, CPMP/SWP/2599/02, London, 23, January (2003)
- 4) Bolton, B. M. and DeGergorio, T., Trends in development cycles, *Nature Rev. Drug Disc.*, **1**, 335-336 (2002)
- 5) 「開発段階別化合物数と承認取得数(日本)」及び「ステージ別新薬開発成功率(米国)」, DATA BOOK 2000 日本製薬工業協会編集, 1-42, 及び 2-22 (2000)
- 6) Monro, A. and Mehta, D., Are single-dose toxicology studies in animals adequate to support single doses of a new drug in humans?, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **59**, 258-264 (1996)
- 7) Directive 2001/20/EC of the European Parliament and of the Council of 4 April 2001, *Official Journal of European Communities*, 121/34-44, 15, 2001 (2001)
- 8) Williams, P., Zannikos, P., Weaner, I., Stubbs, R. J., Van Marle, S. P., Garner, R. C. and Hutchison, J., Accelerator mass spectrometry (AMS) and “microdosing” to evaluate the clinical pharmacokinetics (PK) of a new agent, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **71**, 75 (2002)
- 9) Lappin, G. and Garner, R. C., Big physics, small doses: the use of AMS and PET in human microdosing of development drugs, *Nature Rev. Drug Disc.*, **2**, 233-240 (2003)
- 10) Garner, R. C., Goris, I., Laenen, A. A. E., Vanhoutte, E., Meuldermans, W., Gregory, S., Garner, J. V., Leong, D., Whattam, M., Calam, A. and Snel, C. A. W., Evaluation of accelerator mass spectrometry in a human mass balance and pharma-

- cokinetics study-experience with ^{14}C -labeled (B)-6-[amino(4-chlorophenyl) (1-methyl-1-*H*-imidazol-5-yl) methyl]-4-(3-chlorophenyl)-1-methyl-2(1-*H*)-quinolinone (R115777), a farnesyl transferase inhibitor, *Drug Metab. Dispos.*, **30**, 823-829 (2002)
- 11) Young, G., Ellis, W., Ayrton, J., Hussey, E. and Adamkiewicz, B., Accelerator mass spectrometry (AMS): recent experience of its use in a clinical study and the potential future of the technique, *Xenobiotica*, **31**, 619-632 (2001)
- 12) Dain, J., Warsheski, J., Garner, R. C. and Fisher, V., Low dose ADME studies using ^{14}C -isotopes: application to early drug development, *Drug Metab. Rev.*, **32**(sup 2), 148 (2000)
- 13) 馬屋原 宏, 「単回 microdosing 臨床試験」(EU 型スクリーニング Phase 1 試験)とその実施のための非臨床安全性試験, 臨床評価 別刷, **31**, 331-350 (2004)
-