

Non Clinical Safety Research

試験メニュー

in vitro Exploratory Safety Studies

- ▶ 細胞傷害性
 - ・ Glu/Gal cytotoxicity assay
- ▶ リン脂質症
 - ・ Phospholipidosis assay
- ▶ 心毒性 (QTリスク)
 - ・ hERG binding assay
 - ・ hERG auto-patch assay (QPatch/IWQ)
 - ・ MEA (Multi Electrode Array) assay
- ▶ オフターゲット
 - ・ Promiscuous/diversity panel
- ▶ 遺伝毒性
 - ・ Umu microtest
 - ・ Ames 試験
 - ・ in vitro 小核試験
 - ・ Multi-Flow DNA damage assay
- ▶ 光毒性
 - ・ 紫外/可視光吸収スペクトル試験
 - ・ 3T3 NRU 光毒性試験

in vivo Exploratory Safety Studies

- ▶ 探索的反复投与毒性試験
 - ・ TK/忍容性試験
 - ・ 本試験用量設定
- ▶ 探索的心血管安全性試験
 - ・ げっ歯類
 - ・ 非げっ歯類
- ▶ 胚・胎児予備発生毒性試験
- ▶ ナノ粉碎調製による吸収性の改善検討
- ▶ in vivo 光毒性試験

Investigative Safety Studies / Target validation/Efficacy Studies

- ▶ 薬効試験内での探索的毒性評価
- ▶ 疾患モデル、Tg/KO動物の特性解析
- ▶ 神経電気生理学的検査
- ▶ 眼毒性機作・眼機能評価試験
- ▶ 免疫抑制動物を用いた再生医療実験
- ▶ 病理特殊染色
- ▶ 免疫組織染色
- ▶ 組織形態計測
- ▶ 電子顕微鏡検査
- ▶ 臨床病理学的検査
- ▶ 再生医療等製品開発のための探索的造腫瘍性試験

in vivo Safety Studies *

- ▶ 臨床試験実施申請 (IND) 資料用試験
 - ・ 反復投与毒性試験
 - ・ 安全性薬理試験
 - ・ 遺伝毒性試験
- ▶ 医薬品製造販売承認申請 (NDA) 用試験
 - ・ 生殖発生毒性試験
 - ・ 長期反復投与毒性試験
 - ・ がん原性試験

*: 医薬品GLP対応 (一部、再委託を含む)

試験概要

in vitro Exploratory Safety Studies

▶ 細胞傷害性

Glu/Gal cytotoxicity assay

試験概要: in vitro細胞傷害性評価は、標的臓器毒性リスク早期回避に重要な情報を提供する。本アッセイでは、HepG2細胞のATP含量を評価指標としている。また、薬物性肝障害 (drug-induced liver injury: DILI) との関連性が指摘されているミトコンドリア障害をガラクトース添加培地にて評価する。

▶ リン脂質症

Phospholipidosis assay

試験概要: 薬物誘発性リン脂質症 (phospholipidosis) は、細胞内にリン脂質が過剰に蓄積する現象で、種々の化合物によって誘発されることが報告されている。本アッセイでは、HepG2細胞に被験物質及び蛍光標識リン脂質を24時間処理した後、細胞内蛍光強度を検出し、phospholipidosisのポテンシャルを評価する。

▶ 心毒性 (QTリスク)

hERG binding assay

試験概要: 心室再分極遅延 (QT間隔延長) に関わるイオンチャンネルの代表であるhERGチャンネルと被験物質の親和性をラベル標識されたligandを用いて評価する。アッセイは、1濃度 (= 30 μ M) 評価による阻害率、あるいは複数濃度評価によるIC₅₀算出の選択が可能。

hERG auto-patch assay (QPatch/IWQ)

試験概要: 電気生理学的研究で汎用されている全自動パッチクランプシステム: Sophion社QPatch (IC₅₀値) あるいはMolecular Device社IonWorks Quattro (IWQ, 2濃度阻害率) とCHO hERG DUO細胞を用い、被験物質のhERG電流に及ぼす影響を評価する。

MEA (Multi Electrode Array) assay

試験概要: ヒトにおける心循環リスク予測モデルとして期待が高まっているヒトiPS細胞由来心筋細胞を用いて、MED64 Quad I system (Alpha MED Scientific Inc.) により、Field potential duration、拍動数を測定し、被験物質のQT間隔延長や変時作用ポテンシャルを評価する。

▶ オフターゲット

Promiscuous / diversity panel

試験概要: 被験物質の望ましくないOff-target活性を予測する目的で、開発早期に実施するスクリーニングアッセイ。毒性に関与することが知られている代表的なターゲットへの影響を各種Binding assayまたはFunctional assayを用いて評価する。

▶ 遺伝毒性

Umu microtest

試験概要: *umuC'*-*lacZ*融合遺伝子を導入したサルモネラ菌 (TA1535株) を用いた短期変異原性試験。細菌にDNA傷害が生じると単鎖DNAがシグナルとなりSOS反応が誘発され、*umu*遺伝子のプロモーター調節下にある*umuC'*-*lacZ*融合遺伝子が発現する。その産物蛋白の β -galactosidase活性を測定し、*umuC*遺伝子発現の誘導力から被験物質のDNA損傷性を評価する。必要検体量が少なく (1 mg未満)、スクリーニング試験向けの特徴を有している。

Ames試験

試験概要: サルモネラ菌2株 (TA98およびTA100株) を用いた探索的Ames試験。代謝活性化および非代謝活性化の2処理条件下において被験物質の突然変異誘発能を評価する。

in vitro小核試験

試験概要: ヒトリンパ芽球細胞株 (TK6細胞) を用いた探索的なin vitro小核試験。代謝活性化 (3hr) および非代謝活性化 (24hr) の2処理条件下において、被験物質処理後の間期細胞に形成された小型の核 (小核) を検出することで、被験物質による染色体異常の誘発を評価する。

Multi-Flow DNA damage assay

試験概要: ヒトリンパ芽球細胞株 (TK6細胞) を用いた遺伝毒性発現機序の確認・精査用の試験。DNA二重鎖切断マーカー (γ H2AX)、有糸分裂マーカー (pHH3)、核内p53および多核細胞 (polyploidy) の誘発をフローサイトメーターで評価する。

試験概要

▶ 光毒性

紫外/可視光吸収スペクトル試験

試験概要：被験物質の光反応性評価のため、メタノールおよびpH7.4リン酸塩緩衝液（メタノール含有）中におけるUV-可視光領域（290-700nm）の吸収スペクトルを測定し、モル吸光係数（Molar Extinction Coefficient: MEC）を算出する。MECが $1000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ を上回らない被験物質は直接的に光毒性を引き起こす光反応性がないと考えられる（ICH S10ガイドライン）。

3T3 NRU 光毒性試験

試験概要：化合物の光毒性誘発能をBalb/cマウス由来3T3細胞を用いて評価する光毒性スクリーニング試験（8濃度、n=3）。擬似太陽光照射装置（SXL-2500V2、セリック社）を用いて、光照射の有無による細胞生存率の差を評価する。

in vivo Exploratory Safety Studies

▶ 探索的反復投与毒性試験

TK/忍容性試験

試験概要：ラット、RasH2マウス、ウサギ、イヌやサルに薬物を単回あるいは複数回投与し、動物の症状を観察し忍容性を評価する。また、経時的に血中薬物濃度を測定し、薬物動態を調べる。イヌやサルでは同じ動物を用いて3~7日程度の休薬期間を設け、漸増投与を行う。

本試験用量設定

試験概要：ラット、イヌやサルを用いて、薬物を3~14日間反復投与し、一般状態、体重、摂餌量、眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学的検査、剖検、器官重量、病理組織学的検査を実施する。血中薬物濃度測定も行う。薬物の特性に応じた追加検査にも対応可能。

▶ 探索的心血管安全性試験

げっ歯類

覚醒下（テレメトリー法、シーベル法）あるいは麻酔下の条件で試験が可能。

- テレメトリー法

試験概要：テレメトリー送信器を予め留置したラットを用い、薬物投与前後の血圧、心拍数、体温および活動量が無麻酔無拘束下で継続的に記録する。

- シーベル法

試験概要：ラット大腿静脈及び大腿動脈にカテーテルを予め留置し、薬物を静脈内投与した際の血圧および心拍数に及ぼす影響を観血的に観察。同時に薬物の血液中濃度の測定も可能。

- 麻酔下法

試験概要：麻酔下のラット大腿静脈及び大腿動脈にカテーテルを設置し、薬物を静脈内投与した際の血圧および心拍数に及ぼす影響を観血的に観察する。

非げっ歯類

試験概要：テレメトリー送信器を予め留置したイヌやサルを用い、薬物投与前後の血圧、心拍数、心電図、体温および活動量が無麻酔無拘束下で継続的に記録する。最新の設備、テレメトリーシステムにより、様々なタイプの試験デザイン及び心電図解析（QT/QTcなど）が可能。

▶ 胚・胎児予備発生毒性試験

試験概要：ラット、マウスやウサギの妊娠期間中に薬物を投与し、母動物および胚・胎児への影響を調べる。また、母動物の血中薬物濃度を経時的に測定し薬物動態を調べる。

▶ ナノ粉砕調製による吸収性の改善検討

試験概要：高用量を経口投与しても被験物質の吸収性が悪く必要な暴露量を確保できない場合、吸収性の改善が必要となる。目標とする粒子径に必要なナノ粉砕調製条件設定、凝集性の評価を行い、血中薬物濃度測定実験により吸収性の改善を確認する。

▶ in vivo 光毒性試験

試験概要：ヘアレスマウスあるいはラットに薬物を単回あるいは反復投与し、血中薬物濃度が最も高くなる時間帯で擬似太陽光（SXL-5009V1、セリック社）を照射し、皮膚に発現する紅斑、浮腫及び鱗屑の発現強度及び発現頻度から光毒性を評価する。

試験概要

Investigative Safety Studies / Target validation / Efficacy Studies

▶ 薬効試験内での探索的毒性評価

試験概要：薬効試験のサンプルを用いて探索的に毒性評価を行う。毒性懸念を早期に把握し、将来の毒性試験計画に必要な情報を取得する。

▶ 疾患モデル、Tg/KO動物の特性解析

試験概要：臨床病理、分子病理、病理組織学的手法を用いてノックアウト (KO) やトランスジェニック (Tg) 動物を含めた各種疾患モデルの特性解析、疾患モデルとしての妥当性評価を行う。

▶ 神経電気生理学的検査

試験概要：麻酔下のイヌにおける運動神経伝導検査、F波伝導検査、感覚神経伝導検査、H反射検査および短潜伏時性感覚誘発電位検査の実施。麻酔下のマウスにおける坐骨神経の電気刺激で誘発される下腿筋 (前脛骨筋、腓腹筋など) の反応検査。イヌ、マウス共に同一個体から経日的な測定が可能。

▶ 眼毒性機作・眼機能評価試験

試験概要：眼毒性の機作解明アプローチあるいは薬物の眼球への作用評価のため各種機能パラメータを評価する。

評価項目 (例)：

網膜電図、眼圧、蛍光眼底検査、存命角膜細胞、存命視神経乳頭形態、水晶体混濁 (Scheimpflug camera、水晶体器官培養)、涙液量、組織内薬物濃度測定 (眼房水、水晶体、網膜、角膜)

▶ 免疫抑制動物を用いた再生医療実験

試験概要：カニクイサルあるいはブタの免疫抑制動物を作出し、自家あるいは他家iPS細胞などの再生等医療製品の組織生着評価、薬理実験、安全性評価試験に対応。

▶ 病理特殊染色

試験概要：各種病理診断、病態解析のための特殊染色 (25種類) に対応可能。

▶ 免疫組織染色

試験概要：凍結切片、パラフィン切片等の免疫組織切片を作製、評価を行う。目的に合わせた染色条件の検討、バリデーションも対応可能。

▶ 組織形態計測

試験概要：各種組織染色標本のデジタル画像 (Whole slide image) を取得し、画像解析ソフトを用いて組織形態計測を実施する。ターゲットタンパク質の発現分布のマッピング等にも対応可能。

▶ 電子顕微鏡検査

試験概要：透過電子顕微鏡 (TEM)、走査電子顕微鏡 (SEM) の標本作製および超微形態評価。

▶ 臨床病理学的検査

試験概要：血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査において毒性試験で標準的な測定項目に加え、精査・リスク評価のためのバイオマーカー測定に対応。血漿適合性試験、血液凝固系試験、血小板凝集能試験も実施可能。

▶ 再生医療等製品開発のための探索的造腫瘍性試験

in vitro試験

試験概要：培養増幅法を用いて細胞加工製品に混入する未分化多能性幹細胞の検出を高感度に評価。

in vivo試験

試験概要：評価細胞を高度免疫不全マウスであるNOGマウスに移植し、造腫瘍性の有無を腫瘍の体積および病理組織学的検査で評価。

Consultation

- 各開発段階での非臨床安全性コンサルテーション
- 非臨床安全性評価に関する当局対応相談