

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590187

研究課題名(和文) 同一薬効成分の医薬品適用時におけるヒト肝毒性イベントのリスク予測法に関する研究

研究課題名(英文) Development of a system to predict the bioequivalency of risk of drug-induced hepato toxicity in humans in the case of using generic and counterpart drug formulations

研究代表者

中嶋 幹郎 (Nakashima, Mikiro)

長崎大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：00260737

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：同一薬効成分を有するものの製剤中の添加剤が異なる医薬品をヒトに使用する場合の薬剤性肝障害リスクを予測する方法を開発するため、ヒト肝細胞に高度に置換された肝臓を持つヒト肝細胞キメラマウスを用い、スタチン等の後発医薬品と先発医薬品の被験製剤投与後のヒト肝細胞遺伝子発現量の網羅解析を行った。その結果、様々な薬効成分の後発医薬品についてその先発医薬品とのヒト肝障害リスクに関する製剤同等性を明らかにした。そして、ヒト臨床試験とは別の方法で製剤由来のヒト肝障害発症リスクの予測が可能な本法を Toxicity of Liver Examination 法(T-LEX法)と命名し、その産業財産権を取得した。

研究成果の概要(英文)：We examined changes in hepatic gene expression induced by administration of a generic drug, such as statin, and its brand name counterpart using chimeric mice with highly humanized liver, in order to develop a system to predict the bioequivalency of risk of drug-induced hepatotoxicity in humans in the case of using different drug formulations. As a result, bioequivalency of risk of drug-induced human hepatotoxicity with generic and counterpart formulations of various drugs was clarified. The present system which is not a human clinical test was named the Toxicity of Liver Examination method (T-LEX method), and the industrial property rights were acquired.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：医療系薬学

キーワード：後発医薬品 薬剤性肝障害 ヒト肝細胞キメラマウス トキシコゲノミクス 品質試験 薬剤反応性 T-LEX 安全性試験

## 1. 研究開始当初の背景

我が国では、新薬（先発医薬品）と同じ薬効成分を有する医薬品（後発医薬品）の使用環境の整備と医療機関における利用促進が図られている。しかし、その進捗は必ずしも順調ではない。その理由としては、後発医薬品の安全性や有効性に関する科学的情報の不足が指摘されている。

後発医薬品の安全性と有効性に関しては、先発医薬品の使用実績で確認されていると仮定されるため、生物学的同等性試験等を実施し基準をクリアすれば、後発医薬品の品質等は先発医薬品と同等であると評価され、その製造は許可される。したがって、後発医薬品にはその添加剤が先発医薬品のものとは異なっているにもかかわらず、先発医薬品に対して義務づけられている毒性試験データは存在しない。そこで先発医薬品と同じ薬効成分を有する後発医薬品の各製剤間相互の品質を評価・比較する場合には、製剤の溶出性等に係わる情報が提供されている「医療用医薬品品質情報集」いわゆる「日本版オレンジブック」を参考にするしかない。しかし、最近、経口吸着炭製剤の先発医薬品と後発医薬品では、慢性腎不全ラットを用いた動物実験の結果、腎不全の抑制効果に差があったとする報告や慢性腎臓病患者を対象にオープンラベル無作為化並行群間比較試験を行った結果、臨床での治療効果に差があったとする報告等が相次いで発表されている。つまり、同一薬効成分の医薬品ではあるが製造会社により添加剤が異なる後発医薬品を患者に適用する場合の安全性や有効性を判断できる科学的情報は十分に整備されているとは言いがたい。この実情は国外でも同様である。

一方、肝臓は薬物の代謝・解毒を制御する重要な臓器であり、医薬品による肝障害の発症リスクを予測する情報は、後発医薬品を選択・使用する場合において極めて重要な安全性情報と考えられる。

したがって、臨床現場からは、本研究において提唱する後発医薬品のヒト肝障害リスクに関する科学的情報の整備に向けた取組が望まれている。

## 2. 研究の目的

本研究では、(1) マウスの肝細胞をヒト肝細胞に置き換えたキメラマウス（ヒト肝細胞キメラマウス）とトキシコゲノミクス的手法を活用することで、同一薬効成分を有するものの製剤中の添加剤が異なる医薬品をヒトに使用する場合の薬剤性肝障害リスクを予

測する評価系を開発すること、(2) その評価系を用いて、重篤な肝障害の副作用が懸念されている後発医薬品のヒト肝障害の発症リスクに関する情報を精査し、臨床現場で必要とされている後発医薬品の品質に関する実用性の高い安全性情報を発信することに取り組んだ。

## 3. 研究の方法

### (1) 被験医薬品の選択

臨床において重篤な肝障害の副作用が懸念されている抗リウマチ薬のメトトレキサート製剤（カプセル）、高脂血症薬のスタチン製剤（アトルバスタチン錠、プラバスタチン錠、シンバスタチン錠）、消化器官用薬のモサプリドクエン酸塩製剤（錠）の5種類の後発医薬品（東和薬品）とそれぞれの先発医薬品を被験製剤に選んだ。

### (2) 被験動物

ヒト肝細胞キメラマウスとして、肝細胞のヒト肝細胞への置換率が70～90%と高いPXBマウス（フェニックスバイオ）を用いた。

### (3) ヒト肝細胞キメラマウスを用いたヒト肝細胞遺伝子解析

先発医薬品と後発医薬品の被験製剤を粉砕して0.5%メチルセルロース溶液に懸濁し、PXBマウスに1日1回高用量を3日間経口投与した。コントロール群には、製剤を含まない0.5%メチルセルロース溶液を投与した。最終投与の24時間後にPXBマウスを断頭放血致死し、肝臓を採取した。得られた肝臓より100mg程度の小片を採取して氷冷したRNALater（Applied Biosystem Japan）中で細断し、4℃で24時間保管した。ヒト肝細胞の肝Total RNA試料はRNeasy Kit（キアゲン）を用いて調製した。マイクロアレイの手法により、薬物の代謝・解毒に関連するヒト肝細胞遺伝子の発現変動をGeneChip（Human Genome U133 Plus 2.0 Array）を用いて網羅解析した。

### (4) ヒト肝障害リスク評価

マイクロアレイで解析可能な全てのヒト肝細胞遺伝子について、両製剤投与群とコントロール群の遺伝子発現量を比較してfold-changeを計算した。その値が2以上、もしくは0.5以下の遺伝子についてfold-changeの対数変換値を用いて両製剤投与群とコントロール群を比較し、相関係数を求めた。またヒートマップを用いて、先発医薬品と後発医薬品の投与群間における遺伝子発現変動を比較することで、両製剤のヒト肝障害リスクを比較した。また個々のヒト肝障害関連の代謝経路についても同様な解析を行うことで、より詳細な比較を行った。

(5) ヒト肝細胞遺伝子解析によるヒト肝障害リスク評価データと製造販売後調査による肝障害発現頻度データとの比較

後発医薬品のアトルバスタチン錠（東和薬品）を初回投与した高コレステロール血症患者等 1080 例を対象に、肝機能異常と肝障害の発現頻度を調査し、先発医薬品の添付文書情報と比較した研究報告（福井真理ら、医学と薬学、2013、70、79-100）のデータと、本法により得られたアトルバスタチン錠のヒト肝障害リスク評価データとを比較した。

#### 4. 研究成果

(1) ヒト肝細胞遺伝子解析によるヒト肝障害リスク評価

メトトレキサートカプセルの先発医薬品と後発医薬品投与時のヒト肝障害リスクを予測した。両製剤投与群ではコントロール群に比べて様々なヒト肝細胞遺伝子群の発現パターンに変化が認められた。また逆行した変化を示した遺伝子群も一部見られたが、発現変動した全遺伝子の相関係数は 0.99 であり、両製剤の遺伝子発現に及ぼす影響は同等であった（図 1）。

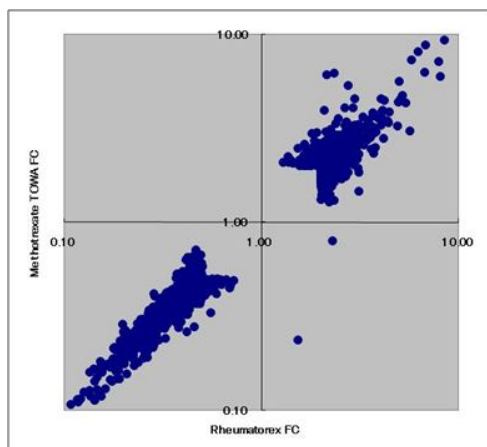


図 1. メトトレキサートカプセル投与時の遺伝子発現量変動の比較（横軸：先発医薬品、縦軸：後発医薬品）

そこで、ヒト肝障害の原因ともなる 18 種類の主要な代謝経路に関して両製剤間の遺伝子発現パターン変化を比較したところ、急性期反応（相関係数 0.58）と脂肪性肝炎（相関係数 0.75）を除く 16 種類の代謝経路ではほぼ一致したパターン変化を示し、相関係数は 0.80 以上の値であった（表 1）。このようにメトトレキサートカプセルの先発医薬品と後発医薬品のヒト肝障害関連遺伝子群の発現変動に製剤同等性が認められたことから、両製剤投与時のヒト肝障害リスクは同程度であると推測できた。

表 1. ヒト肝障害関連代謝経路でのメトトレキサートカプセル投与時の遺伝子発現変動の相関性

経路	相関係数
NF2 関連酸化ストレス経路	0.93
HIF1 関連低酸素症経路	0.89
EIF2 関連ストレス反応	0.97
炎症（NF- B シグナル経路）	0.91
アポトーシス	0.96
細胞周期	0.90
TGF- シグナル経路	0.95
AHR シグナル経路	0.95
核内受容体および薬物代謝酵素	0.88
脂肪酸生合成	0.80
酸化	0.90
コレステロール生合成	0.98
ステロイド代謝	0.91
葉酸代謝経路	0.98
急性期反応	0.58
脂肪性肝炎	0.75
胆汁うっ滞	0.94
肝線維化	0.95

さらに 3 種類のスタチン製剤（アトルバスタチン錠、プラバスタチン錠、シンバスタチン錠）とモサプリドクエン酸塩錠の先発医薬品と後発医薬品について同様な試験を行い、肝臓でのヒト遺伝子発現量の変動パターンを比較した。その結果、発現変動した全遺伝子の相関係数は、アトルバスタチン錠 0.95、プラバスタチン錠 0.99、シンバスタチン錠 0.99、モサプリドクエン酸塩錠 0.93 を示し、試験した全ての医薬品で、両製剤間におけるヒト肝障害リスクは同程度であることが示された。

これらの結果から、ヒト肝細胞キメラマウスとトキシコゲノミクスの手法を用いる本法により、様々な薬効成分の後発医薬品について、その先発医薬品とのヒト肝障害リスクに関する製剤同等性を明らかにすることができたため、本評価法を Toxicity of Liver Examination 法（T-LEX 法）と命名し、その産業財産権を出願、取得した（商標第 5617856 号）。

(2) ヒト肝細胞遺伝子解析によるヒト肝障害リスク評価データと製造販売後調査による肝障害発現頻度データとの比較

アトルバスタチン錠の製造販売後調査の結果、患者での肝機能異常と肝障害の発現頻度はそれぞれ 0.56% と 0.28% であった。これらの値は先発医薬品のデータ（肝機能異常：1.21%、肝障害：0.21%）と比較してもほぼ同等で、両製剤の臨床での肝障害発現頻度は同程度であることが示された。アトルバスタチン錠は、すでに T-LEX 法による解析でヒト肝障害関連遺伝子群の発現変動に先発医薬品と同等性が認められているため、本法により臨床での肝障害イベントの発症リスクを予測することが可能であるとの知見

を得た。

今回開発した T-LEX 法は、ヒト臨床試験とは別の方法で製剤由来のヒト肝障害発症リスクの予測が可能のため、販売時に十分な規模の臨床試験データの提供が困難な後発医薬品を臨床現場で安心して使用するための極めて有益な新技術になると期待できる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

##### [雑誌論文](計2件)

立木秀尚、ジェネリック医薬品評価の最新技術～ジェネリック医薬品の薬剤性肝障害リスク評価法～、ファームテックジャパン Vol.29 No.15、査読無、29、3079-3083 (2013)

Mikiro Nakashima, Hidehisa Tachiki, Hatsune Enomoto, Takashi Shimada, Shin-ichiro Nagatsuka, Changes in hepatic gene expression induced by various statin formulations in chimeric PXB-mouse with highly humanized liver, Toxicology Letters, 査読無、221、S194 (2013)

##### [学会発表](計12件)

榎本初音、新規薬剤性ヒト肝障害リスク予測法(T-LEX法)と臨床での肝障害発現頻度の比較研究、第34回日本臨床薬理学会学術総会、2013年12月4-6日、東京

中嶋幹郎、新規薬剤性ヒト肝障害リスク予測法(T-LEX法)の開発(1)～ジェネリック医薬品による有用性の検討～、第23回日本医療薬学会年会、2013年9月21-22日、仙台

中嶋幹郎、新規薬剤性ヒト肝障害リスク予測法(T-LEX法)の開発とアトルバスタチン錠ジェネリック医薬品の品質試験への応用、日本ジェネリック医薬品学会第7回学術大会、2013年7月6-7日、東京

立木秀尚、新規な薬剤性ヒト肝障害リスク予測法(T-LEX法)による医薬品添加剤のヒト肝障害リスクへの影響予測、日本薬剤学会第28年会、2013年5月23-25日、名古屋

中嶋幹郎、新規薬剤性ヒト肝障害リスク予測法(T-LEX法)によるモサブリドクエン酸塩錠の先発医薬品・ジェネリック医薬品の比較研究、日本薬学会第133年会、2013年3月27-30日、横浜

中嶋幹郎、ヒト肝細胞キメラマウスを用いたアトルバスタチン錠の薬剤性肝障害リスク予測に関する研究、日本ジェネリック医薬品学会第6回学術大会、2012年6月22-23日、東京

Mikiro Nakashima、Evaluation of hepatotoxic equivalency by comparing changes in hepatic gene expression induced by two different formulations of atorvastatin in chimeric PXB-mouse with highly humanized liver, 51<sup>st</sup> Annual Meeting of Society of Toxicology, March 11-15, 2012, San Francisco, USA

中嶋幹郎、同一有効成分の医薬品適用時における薬剤性肝障害のリスク予測法に関する研究、日本ジェネリック医薬品学会第5回学術大会、2011年6月18-19日、東京

##### [産業財産権]

出願状況(計1件)

名称:T-LEX

発明者:中嶋幹郎、東和薬品株式会社

権利者:同上

種類:特許

番号:商願2013-017412

出願年月日:25年3月12日

国内外の別:国内

取得状況(計1件)

名称:T-LEX

発明者:中嶋幹郎、東和薬品株式会社

権利者:同上

種類:特許

番号:商標第5617856号

取得年月日:25年9月27日

国内外の別:国内

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

中嶋 幹郎 (NAKASHIMA, Mikiro)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号:00260737

##### (2)研究協力者(国内共同研究者)

島田 卓 (SHIMADA, Takashi)

株式会社フェニックスバイオ・研究員

長塚 伸一郎 (NAGATSUKA, Shin-ichiro)

積水メディカル株式会社・薬物動態研究所・研究員

立木 秀尚 (TACHIKI, Hidehisa)

東和薬品株式会社・研究開発本部・研究員