COMMENTARY

創薬初期の安全性評価における質量分析の活用

The Role of Mass Spectrometry for Safety Evaluation in the Drug Discovery Stage

山本利憲

Toshinori YAMAMOTO

ファイザー株式会社中央研究所安全性研究統括部探索安全性研究部 *Drug Safety Research & Development, Pfizer Global Research & Development, Nagoya Laboratories, Pfizer Inc., Taketoyo, Chita-gun, AICHI, JAPAN*

Recent advances in drug discovery technologies require a paradigm shift in safety evaluation of drug candidates, especially with respect to their toxicological contribution at the early stage of drug discovery. In this context, new sciences and technologies should be implemented in the field of safety evaluation, and the numerous applications of mass spectrometry (MS) are thought to be one of the key approaches. In the present review, we have summarized the usability of MS and its practical applications in early safety evaluation.

(Received February 4, 2008; Accepted February 22, 2008)

1. はじめに

従来、新薬開発における医薬品候補物質の安全性評価は、治験薬許可申請 (Investigational New Drug Application: IND) および新薬承認申請 (New Drug Application: NDA) に必要とされる毒性試験の実施を中心に進められてきた。しかしながら、近年では、安全性評価において多くの転換、いわゆるパラダイム・シフトが求められている。その要求の主なものとして、安全性評価の創薬段階への貢献が挙げられる。すなわち、安全性評価をこれまでと比較して、より開発の初期に実施し、開発候補化合物に起因する毒性をあらかじめ予測し、そしてそれに関してケアを施しておくことが期待されている。この命題に確実に応えていくためには、安全性評価に新しいサイエンスおよびテクノロジーの導入を検討することが不可欠であり、その一つとして質量分析 (Mass Spectrometry: MS) を用いたさまざまなアプローチが活用できると考えられる。

本稿においては、創薬安全性評価における質量分析の活用としてトキシコパノミクスによる毒性学的バイオマーカー探索を、そして創薬段階だけでなく臨床までを鑑みた安全性評価への質量分析の応用として薬物代謝酵素のジェ

ノタイピングをトピックスとして取り上げ、将来への展望を含めて解説を加えたい。

2. 医薬品の創薬開発の実際と創薬安全性評価

医薬品の創薬開発は非常に大きなリスクを伴っており、その成功率が製薬企業の存続までも左右すると言っても過言ではない。その理由は、開発候補品が上市に至るまでの低い成功率にある。一般的に、約 1,100 万個の候補化合物のスクリーニングからスタートして、ようやく一つの薬剤の承認に至ると言われており、その開発期間に関しても、探索研究、非臨床開発研究、臨床開発研究および承認申請後の審査期間までを考慮すると、アイデアから市販まで 15 年程度が必要とされる¹⁾。2006 年の米国 Government Accountability Office (GAO) の白書に、1993 年から 2004 年までの医薬品開発への投資額および承認申請の件数などがまとめられている²⁾。その報告によると、調査が実施された 12 年間に於いて、医薬品開発への投資額は 1.5 倍程度に増加しているにもかかわらず、最終的に NDA 申請に至る化合物の数はむしろ減少しており、1999 年以降ではその傾向が顕著である (Fig. 1)。特に、NDA 申請に至った化合物のうち、新規分子化合物医薬品 (New Molecular Entities: NME) に注目すると、その数は 1995 年以降減少の一途をたどっている。一方で、この期間に IND 申請がなされた化合物の数は増加傾向を示している。このことから、IND 申請以降の NDA 申請までの期間、すなわち化合物が臨床のステージに入った後に、非臨床ステージでは予期できなかった要因 (有効性、安全性など) によって開

Correspondence to: Toshinori YAMAMOTO, *Drug Safety Research & Development, Pfizer Global Research & Development, Nagoya Laboratories, Pfizer Inc., 5-2 Taketoyo, Chita-gun, Aichi 470-2393, JAPAN*, e-mail: Toshinori.Yamamoto@pfizer.com

山本利憲, ファイザー株式会社中央研究所安全性研究統括部探索安全性研究部, 〒470-2393 愛知県知多郡武豊町 5-2

Fig. 1. 医薬品の開発プロセスにおける投資額および申請数 (IND および NDA) の推移 (文献 2 を引用一部改変)
R&D expenditures: Research and development expenditures (研究開発費)

発が中止されたものが増加していることが理解できる。

医薬品候補化合物の開発中止原因は、主として化合物のもつ薬物動態特性が悪いことによるものであった³⁾。これは、ヒトにおけるバイオアベイラビリティの低さや予期できなかった薬物相互作用など、非臨床データからのヒトでの薬物動態プロファイルの予測性が悪いことに起因していた。これらの薬物動態特性は、化合物がもともと持っている物性に依存しているものも多い。また、もう一方の原因としては、安全性・副作用に関する問題が挙げられる。通常、医薬品の安全性評価は開発の比較の後期に実施される。そのため、臨床試験において安全性に予期できない重篤な問題が認められた場合、開発化合物の開発をストップせざるをえない状況を生み、それまでの投資を考慮すると開発企業における影響は甚大となる。米国食品医薬品局 (Food and Drug Administration: FDA) の白書には、一つの医薬品を上市するまでに必要とされる投資に関して、開発ステージごとにおける内訳が示されている⁴⁾。この統計によると、2000 年以降での医薬品開発投資額の増大分は、探索ステージにおける投資の増大に起因するものではなく、ほぼそのすべてが臨床ステージ (フェーズ I, II, および III) における増加分であることが理解できる。

以上のことから、安全性評価をこれまでより前倒しのタイミングで実施すること、すなわち、創薬初期において開発化合物が潜在的にもつ毒性発現プロファイルを知ることが重要となってくる。創薬安全性評価へ期待されることは、(1) 開発初期において開発候補化合物による毒作用 (または毒性の兆候) をとらえること、(2) 非臨床安全性試験または臨床試験において適用可能な毒性評価指標 (毒性学的バイオマーカー) を見つけること、(3) それらを基にヒトにおける副作用を予測すること、である。創薬安全性評価を効率よく実施するためには、これまで用いられている臨床病理パラメーターおよび病理組織学的検査などの手法に加えて、新規エンドポイント (毒性学的バイオマーカーなど) の設定が有用である。

2004 年 3 月、FDA は、医薬品候補の発見から製造に至るまでの科学的プロセスについての基本的考え方を示した (クリティカル・パス)⁵⁾。つづいて、2006 年には、この考

え方に基づき作成された詳細について、クリティカル・パス・オポチュニティー・リスト⁶⁾として公開された。その中で FDA は、「前世紀のツールに頼らざるをえない状況の打破」を謳っており、そのリストのトップ項目にバイオマーカー開発の重要性が述べられている。このような観点からも、安全性評価において、新規サイエンスおよびテクノロジーの積極的導入・適用によるパラダイム・シフトが重要であることは言うまでもない。

3. トキシコパノミクス・テクノロジーを用いた 毒性学的バイオマーカー探索

安全性評価において、毒性学的に意味のあるバイオマーカーの設定は非常に重要である。安全性評価における評価パラメーター (エンドポイント、バイオマーカー) としては、臨床試験で用いられている臨床病理検査項目および病理組織学的検査などを基盤とした伝統的なパラメーターが用いられてきた。近年、創薬安全性評価への要求と遺伝子科学の発展とが相まって、創薬安全性研究に分子毒性学的なアプローチが積極的に取り入れられるようになってきた (ゲノム毒性学, 分子毒性学)。

まず、バイオマーカーについて整理しておきたい。バイオマーカーは、「正常の生物機能の進行, 病態の進行, あるいは治療介入に対する薬理反応の指標として客観的に測定され評価される属性」として定義される⁷⁾。バイオマーカーが成立する条件として、①刺激により誘導または抑制される、②刺激による反応が特異的である、③ルーチン測定において十分な感度をもつ、④実験間/施設間において正確にかつ再現性良く測定されうる、⑤定量的にリスクの程度を見積もることが可能である、などが挙げられる⁸⁾。これらの条件を満たすものとしては、血液生化学パラメーター、心電図、脳波、およびイメージング [Magnetic Resonance Imaging (MRI), Positron Emission Tomography (PET)] など、生体から得られる多くの反応や情報が考えられる。これらすべてがバイオマーカーとなりうるが、本稿においては、パノミクス・テクノロジーにより探索・同定される毒性学的バイオマーカーを取り上げることとする。

パノミクス・テクノロジーを用いた毒性学的バイオマーカー探索は、重要な分子毒性学的アプローチの一つである (トキシコパノミクス)。パノミクスは、ゲノミクス (トランスクリプトミクス)、プロテオミクス、およびメタボノミクス (メタボロミクス) など、さまざまな科学的側面から考究していく分子毒性学的アプローチの総称であるが、それらの解析の中で質量分析が担う役割は大きい。特に、プロテオミクスは、質量分析の技術革新により大きく発展した手法であり、これまでに毒性学的バイオマーカー探索に応用された例も複数報告されている^{9), 10)}。メタボノミクスを用いた毒性学的バイオマーカー探索に関しては、これまで核磁気共鳴 (Nuclear Magnetic Resonance: NMR) を用いた研究¹¹⁾が精力的に行われてきたが、近年、質量分析による大規模な解析が実施されており、そのデータの蓄積も

Fig. 2. 毒性発現をシステムバイオロジー的な視点でとらえた概念図（オミクス・スペース）

a) 毒性関連遺伝子の発現変動がコードするタンパク質へと翻訳され毒性フェノタイプとして現れる場合, b) 毒性関連遺伝子の翻訳産物が他のタンパク質と相互作用することにより毒性フェノタイプの発現へとつながる場合, c) 毒性関連遺伝子の翻訳産物が転写因子などとして機能することにより他の毒性関連遺伝子の発現を制御する場合, d) 毒性関連遺伝子の発現変動がタンパク質へと翻訳されないために毒性フェノタイプが現れない場合, e) 遺伝子には直接制御されない現象が毒性フェノタイプとして現れる場合.

進んでいる^{12), 13)}. 2005年に, 欧米大手製薬企業により開始された COMET-2 プロジェクト (The Consortium for Metabonomic Toxicology-2) においては, 質量分析での検討が精力的に進められている.

パノミクス・テクノロジーによりとらえることが可能な変動因子 (遺伝子, タンパク質, および生体内内因性代謝物) は, 生体反応に呼応するようにカスケード的に発現消失しており, そのタイミングおよび持続時間も因子によりさまざまであると考えられる. Fig. 2 に, オミクス・スペースとして, このことを模式的に示している. すなわち, 考えられうる毒性発現パターンとしては, 生体に毒性発現につながるような刺激が加わったとき, 毒性関連遺伝子がコードするタンパク質に直接翻訳されることにより, 他のタンパク質と相互作用することにより, または, 転写因子として他の遺伝子を制御することにより毒性フェノタイプが現れる場合, 遺伝子へ及ぼされた影響が毒性フェノタイプとして現れない場合, そして, 遺伝子には制御されない毒性フェノタイプが現れる場合などがある. 以上のことから, 質量分析を基盤としたパノミクス・テクノロジーの適切・的確な運用が, 新規毒性学的バイオマーカーの検索同定を成功に導くものと考えられる.

3.1 プロテオミクスによる毒性学的バイオマーカーの探索

ラット初代培養肝細胞に, 肝毒性誘発化合物であるアセトアミノフェン (Acetaminophen: APAP), アミオダロン (Amiodarone: AMD), テトラサイクリン (Tetracycline: TC) および四塩化炭素 (Carbon tetrachloride: CTC) を暴露して, 肝細胞障害時に誘発される分子毒性学的変化をプロテオミクスの手法を用いて検出した例¹⁴⁾を以下に示す. いずれの化合物に関しても, 肝細胞に 3, 6, および 24 時間暴露した後, Lactate dehydrogenase (LDH) 漏出量, WST-1 アッセイによる細胞増殖試験および細胞の形態学的観察により細胞毒性を検出し, それぞれの化合物の暴露

Table 1. ラット初代培養肝細胞に APAP, AMD, TC, および CTC を暴露 6 および 24 時間後における発現変動スポットの数

化合物	暴露時間 (h)	発現変動スポットの数*		
		増加	減少	合計
APAP	6	11	18	29
	24	16	47	63
AMD	6	8	51	59
	24	26	64	90
TC	6	45	41	86
	24	10	39	49
CTC	6	49	29	78
	24	24	103	127

*: 発現量が 2 倍以上有意に変化したスポットの数.

濃度を設定した. プロテオミクス試験では, 化合物暴露 6 および 24 時間に, 肝細胞中の総タンパク質を抽出し, 2 次元電気泳動で展開した. 発現の変動しているタンパク質スポットを探索したところ, 多くのスポットの発現変動が確認された (Table 1). つづいて, これらの発現変動スポットに関して, 質量分析計 (Q-ToF Ultima API) を用いてタンパク質の同定を試み, 同定可能であったタンパク質について gene ontology を基にした機能による分類を行った. 発現が変動した主要なタンパク質群は, 細胞死, 細胞骨格構築, および炭水化物・脂質・アミノ酸代謝に関与するものであった. ここで見いだされた興味深い知見として, 酸化ストレスに応答するタンパク質であるグルタチオン・ペルオキシダーゼ, ペルオキシレドキシン I および II の発現の変動が, 化合物によらず共通して認められたことを強調したい (Fig. 3). 以上の結果に関して, *in vivo* での再現性および相関を検討する, かつ, *in vitro* で認められた酸化ストレス関連タンパク質の肝臓中での発現への影響を確認する目的で, 雄性ラットに上記 4 化合物を毒性用量で単

Fig. 3. APAP, AMD, TC, および CTC を暴露したラット初代培養肝細胞の 2 次元ゲル電気泳動像 (暴露時間: 24 時間)
A) グルタチオン・ペルオキシダーゼ, B) ペルオキシレドキシン I, C) ペルオキシレドキシン II.

回経口投与し、肝臓の免疫組織化学的染色を実施した¹⁵⁾。その結果、検討した多くの酸化的ストレス関連タンパク質の変動が *in vivo* においても化合物に共通して認められており、*in vivo* と *in vitro* が比較的良好に相関していることを確認した。以上のことから、ラット初代培養肝細胞と酸化的ストレス関連タンパク質をバイオマーカーとして利用した *in vitro* High Throughput (HTP) 肝毒性スクリーニングの実現の可能性が示された。

3.2 メタボミクスによる毒性学的バイオマーカーの探索

現在、“メタボミクス”と“メタボロミクス”という用語が、明確な基準をもって使い分けられていないように思うが、実はそれぞれには定義づけがなされている。メタボミクスは個体を対象としており、その代謝活動の総体から得られる計測結果に基づいて、効率よくバイオマーカーにたどりつく手法として用いられている。したがって、メタボミクス研究では尿および血清、血漿（場合によっては臓器）をサンプルとしている場合が多く、臨床への適用などの応用性が強く志向されている。一方、メタボロミクスは、対象としているのが細胞レベルであり、できるだけ多くの対象分子の同定と定量が期待されており、情報科学を駆使したシステム生物学などへの展開を期待しているものである。最近では、両者を区別せずに“メタボミクス”と呼ばれる場合もある。

毒性学的バイオマーカーの探索においては、NMR を用いたメタボミクス試験が多く行われているが、質量分析メタボミクス（メタボロミクス）の手法で見いだされた肝毒性マーカーも報告されている。Soga らは、陽イオン

性および陰イオン性代謝物質の高感度一斉分析を可能とするキャピラリー電気泳動 (Capillary Electrophoresis: CE) 装置と質量分析計を接続した CE/MS (capillary electrophoresis/mass spectrometry) の手法を開発し、これを APAP 肝毒性のバイオマーカー探索に適用した¹⁶⁾。彼らは、APAP を単回腹腔内投与したマウス肝臓のメタボミクス解析を実施し、投与後初期においてグルタチオン (glutathione: GSH) 合成経路の複数の代謝物質が顕著に減少していること、および還元型 GSH の減少にリンクしてオフタルミン酸が増加することを報告した¹³⁾。さらに、血清中オフタルミン酸に関しても、肝臓内での動きに合わせて増加することを示したところが非常に興味深く、非臨床および臨床での実用につながる可能性が広がると期待できる。実際、2007 年 11 月に東京で開催された第 2 回メタボローム・シンポジウムにおいて、黄疸患者の血液分析へオフタルミン酸の分析を適用した試験が、研究レベルではあるが開始されたことが報告された。

3.3 システムバイオロジー的視点からの毒性学的バイオマーカーの探索

網羅的解析手法であるパノミクス・テクノロジーは、毒性学的バイオマーカー探索において非常に有力なツールであるには違いないが、その一方で、意味のある結果に至るのは容易でないこともわかってきた。そこで、網羅的解析と併行して、これとは異なる方向からのアプローチ、すなわちシステムバイオロジー的な視点からのアプローチを毒性学的バイオマーカー探索に適用していくことが効果的であろう。網羅的手法を用いた毒性学的バイオマーカー探索を“ボトムアップ的”手法とすれば、システムバイオロジー的な視点からの毒性学的バイオマーカーの検索を“トップダウン的”手法とすることができる。後者は、ターゲットとする毒性の発現メカニズムに起因する各種分子毒性学的因子に関して、その傷害に至るまでのバイオリジカル・パスウェイ解析から推測される関連遺伝子、関連タンパク質または関連内因性代謝物などの変動について確認するというプロセスで毒性学的バイオマーカーを特定する。このようにして注目した毒性学的バイオマーカー候補の発現変動解析（バリデーション）手法として、Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) などの生物学的な方法に加えて、正確性、簡便性および迅速性の観点から LC/MS (liquid chromatography/mass spectrometry) および CE/MS などの質量分析を用いた定量法が有用であろう。

4. ジェノタイピングによる薬物代謝酵素 SNPs の民族間比較

現在、メガファーマと言われる大手医薬品企業（日本の大手製薬会社含む）は、世界的規模での新薬開発を行っている。しかしながら、新薬の主要開発国以外の国における承認獲得については、いまだに困難が伴っているのも現実である。その主な理由は、当該医薬品が投与される民族の違いにある。1998 年、日米 EU 医薬品規制調和国際会議

(ICH: International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) の臨床に関するガイドライン E5¹⁷⁾ において、外国人（申請当該国外住民）の臨床試験データを用いたブリッジング・ストラテジーが提示されているものの、やはりその国の居住民族を用いた最低限の治験データ（フェーズ I 試験およびブリッジング対象フェーズ II 試験）が、申請国の規制当局により要求される。

民族間における薬物動態特性や副作用発現の感受性の差異は、それぞれの民族の居住環境（食事、環境、文化など）に起因するとも言われているが、ファーマコゲノミクスの考察すると、それは 1 塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphisms: SNPs) に帰着されるであろう。SNPs 解析は、将来のテーラーメイド医療の実現にも貢献するものであり、また、民族横断的な大規模ジェノタイピング試験の実施は、日米欧三極における同時申請および迅速な承認獲得に寄与すると考えられる。

大規模ジェノタイピング試験に、MALDI/TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization/time-of-flight) 型の質量分析計を基本としたハイスループット・システムが有用である。近年、日本人 (NJ)、日本以外に居住する日本人（一世 1J および三世 3J）、西洋人 (Ca)、中国人 (Ch)、および韓国人 (Ko) を対象とした大規模試験において、薬物代謝酵素チトクロム P450 (cytochrome P450: CYP) のジェノタイプを、MassARRAY SNP Genotyping System (SEQUENOM, Inc.) を用いて調べた例が報告された^{18), 19)}。この試験のデザインは、以下のとおりである。各民族の健康な成人男性（各群 100 例程度）に、CYP1A1, 1A2, 3A4, 3A5, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, および 2B6 により代謝される薬物を投与して、血漿中または尿中の未変化体/代謝物比を調べてフェノタイプをモニターするとともに、各 CYP 分子種のジェノタイピングを実施した。CYP2C19 の遺伝子多型については、人種間でそのアレル出現頻度が異なることはすでに周知であり、活性低下を伴う遺伝子欠損をもつ代謝欠損者 (poor metabolizer: PM) の頻度は、東洋人で 18~23% 程度、欧米人では 2~5% 程度であると報告されている^{20)~22)}。現在までに、CYP2C19 には 25 種類のアレル変異が報告されているが、このうち活性に影響を及ぼす変異体は CYP2C19*2 および CYP2C19*3 である。Table 2 に、MassARRAY システムで検出したジェノタイピングの結果の一部を示したが、各人種における CYP2C19*2 および CYP2C19*3 をホモまたはヘテロ接合体で有する PM の割合は、従来型のジェノタイピング手法 [Polymerase Chain Reaction (PCR) および電気泳動法] で検出されたものと一致していた。また、CYP2D6 に関しては、欧米人の PM の大部分を説明できるとされる CYP2D6*3, CYP2D6*4 および CYP2D6*5 のバリエーションの発現頻度、および、東洋人に 18% 程度存在すると報告されている活性がやや低い群 (intermediate metabolizer: IM) を説明できる CYP2D6*10 をホモ接合体で有するヒトの割合は、い

Table 2. 質量分析計で測定した西洋人、日本人、韓国人、および中国人における CYP2C19 および 2D6 のジェノタイプの出現頻度
(文献 18, 19 より引用一部改変)

Enzyme	Genotype	Ethnic group*					
		Ca	NJ	1J	3J	Ko	Ch
CYP2C19	*3/*3	0	2	2	1	0	0
	*2/*3	0	4	6	5	4	3
	*2/*2	2	13	8	8	5	6
	*1/*4	1	0	0	0	0	0
	*1/*3	0	10	11	15	12	4
	*1/*2	35	39	33	32	36	43
	*1/*1	104	32	45	21	43	44
CYP2D6	*5/*5	0	0	1	0	0	0
	*5/*14	0	1	0	0	2	0
	*5/*10	0	4	9	5	6	6
	*4/*4	7	0	0	0	0	0
	*4/*36	0	0	0	0	1	0
	*4/*10	2	0	0	0	0	0
	*3/*4	1	0	0	0	0	0
	*10/*36	0	0	0	0	2	0
	*10/*14	0	0	0	0	0	1
	*10/*10×2	0	1	1	0	0	0
	*10/*10	0	18	12	10	19	26
	*1/*6	6	0	0	0	0	0
	*1/*5 ×2	0	0	0	0	0	1
	*1/*5	5	8	4	3	7	6
	*1/*4×2	2	0	0	0	0	0
	*1/*4	33	1	1	0	0	0
	*1/*36	0	0	0	2	1	0
	*1/*3	5	0	0	0	0	0
	*1/*21	0	1	0	0	0	1
	*1/*14	0	0	0	0	3	0
	*1/*10×2	0	0	1	2	0	1
	*1/*10	2	38	47	28	40	40
	*1/*1×2	3	2	1	2	2	0
	*1/*1	76	23	28	30	17	18
	*1×2/*5	0	1	0	0	0	0
	*1×2/*10 or *1/*10×2	0	2	0	0	0	0

* Ca, 西洋人; NJ, 日本人; 1J, 日本人（一世）; 3J, 日本人（三世）; Ko, 韓国人; Ch, 中国人。

ずれも過去の報告と矛盾ないものであった。さらに、本ジェノタイピング試験の結果から、日本人内 (NJ, 1J, および 3J) の比較、または東洋人内 (NJ, Ko, および Ch) での比較では、PM の存在頻度および代謝活性に差は認められず、食事や環境などの外因性の要因、すなわちライフスタイルによる影響は無視できることも明らかとなった。

以上のジェノタイピング試験データから、質量分析を用いたジェノタイピング手法は、迅速性および正確性の観点からも十分に有効であり、従来法の代替になりうると考えられた。今後、グローバル・プロトコルを用いて、多民族を対照とした国際共同治験 (Multinational Study) を実施するにあたり、被験者を無作為に集めるのではなく、質量分析による迅速測定法によるジェノタイピングを適切に組み込んだプロトコルで、被験者を遺伝子多型の情報に基づいて集めることにより、ブリッジング試験の効率化、ひいては同じデータパッケージを用いた世界同時申請/承認取得が実現するものと考えている。

5. 創薬安全性研究におけるさらなる質量分析の活用

質量分析法は、本稿で提示した例に加えて、創薬安全性評価のさまざまな場面で活用できる可能性をもっている。

ジェノタイピング以外のトキシコゲノミクスへの応用としては、real time-PCR に代わる定量手法として、RNA (ribonucleic acid) マススペクトロメトリーという手法が提案されている²³⁾。質量分析は、非常に高感度であるという特性から、シングル細胞内および血液中の微量 DNA (deoxyribonucleic acid)/RNA の検出や、非臨床および臨床試験で作製した病理組織標本（パラフィン切片など）から抽出したメッセンジャー RNA (messenger RNA: mRNA) などの検出に応用可能であると考えられる。ゲノムのデータベースを利用した RNA の迅速な同定法として、ペプチドマスマスフィンガープリンティングの原理を応用した RNA マスフィンガープリンティングという概念も紹介されている。また、近年、タンパク質を直接コードしないノンコーディング RNA (non-coding RNA: ncRNA) が注目されており、RNA を単なる“情報”としてのみではなく、機能をもった“分子”としてとらえることの重要性が認知されるようになってきた²⁴⁾。この場面においても、毒性発現²⁵⁾や薬物代謝酵素の活性制御²⁶⁾に関与しているマイクロ RNA のプロファイリングやエピジェネティック・プロセス (DNA のメチル化、ヒストンのアセチル化など) の検出に、検出対象を質量でとらえる質量分析が基盤技術となりうると考えている。

また、創薬安全性評価に応用可能な手法として、質量顕微鏡 (質量分析イメージング法とも呼ばれている) の探索病理組織検査への適用が考えられる²⁷⁾。この手法は、MALDI マススペクトルで組織または細胞中の生体分子 (タンパク質、脂質、核酸など) を直接可視化するもので、質量分析スペクトルに位置情報を加えて 2 次元展開したものである。この技術の応用には、電子顕微鏡レベルまでの分解能の向上、イオン化効率の改善による感度の向上²⁸⁾など、まだまだ改善すべき点は多いが、探索安全性評価においては免疫組織化学染色の代替法として有用であろう。質量顕微鏡を用いた病理組織解析が実現すれば、切片を染色することなしに、ハイスループットで比較的安価 (抗体などを必要とせず) に複数タンパク質の局在情報を診断できるようになる²⁹⁾。さらに、この技術は、安全性評価にとどまらず、創薬の標的分子の探索同定などにも有力な武器となることが期待できる。

6. おわりに

われわれは、常に新たなサイエンスおよびテクノロジーに注力し、そして、それらを積極的に取り入れることにより、非臨床および臨床の両ステージにおいて創薬安全性評価を加速することが求められている。これまでの毒性評価で用いられてきた有用な評価法は維持しつつ、一方では、新規テクノロジーの導入による新しい評価指標 (毒性学的バイオマーカー) の設定およびそれを用いた新しい評価手

法の必要性も高まっている。しかしながら、ここで一つコメントしておきたいことは、古典的なバイオマーカーは、長年のデータの蓄積と検証により、すでに非常に Robust なものとなっているが、新しい手法で見いだされた毒性学的バイオマーカーに関しては、複数の手法による検証と適切な統計学的検証が必須であるということである。

創薬安全性評価において、質量分析法が非常に強力なツールとなりうることに疑う余地がない。Good Laboratory Practice (GLP) 安全性試験においても、トキシコキネティクス測定に用いるツールは、現在では LC/MS がファーストチョイスである。本稿において例をいくつか挙げて示したように、創薬安全性評価で質量分析法が活用・活躍できる場面は多く、今後も研究者の応用しだいでいくらかでも広がると考えられる。このような背景から、今後、安全性評価部門においても、質量分析計や NMR 装置などの大型精密分析機器の積極的な導入と、それに対応しうる (装置を扱える) 研究者が活躍できる場はさらに広がるものと考えられる。

謝 辞 第 34 回 BMS コンファレンスにおいて講演の機会を与えていただきましたことを、実行委員長の原田健一先生をはじめとするオーガナイザーの先生方に感謝いたします。また、本稿をまとめるにあたって、貴重なデータを提供していただきました Joseph D. Paulauskis 博士、有益な助言をいただきました山田弘博士および堀井郁夫博士に感謝の意を表します。

文 献

- 1) Drug Development Science, FDA (2005).
- 2) New Drug Development: Science, Business, Regulatory, and Intellectual Property Issues Cited as Hampering Drug Development Efforts, GAO-07-49 (2006).
- 3) I. Kola and J. Landis, *Nature Rev. Drug Discov.*, **3**, 711 (2004).
- 4) FDA White Paper—Innovation or Stagnation: Challenge and Opportunity on the Critical Path to New Medical Products (<http://www.fda.gov/oc/initiatives/criticalpath/whitepaper.html>).
- 5) Challenge and Opportunity on the Critical Path to New Medical Products, FDA (2004).
- 6) Critical Path Opportunities Report and List, FDA (2006).
- 7) Biomarker definitions working group, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **69**, 89 (2001).
- 8) A. D. Benninghoff, *Toxicol. Sci.*, **95**, 1 (2007).
- 9) T. Yamamoto, R. Kikkawa, H. Yamada, and I. Horii, *J. Toxicol. Sci.*, **31**, 49 (2006).
- 10) S. U. Ruepp, R. P. Tonge, J. Shaw, N. Wallis, and F. Pognan, *Toxicol. Sci.*, **65**, 135 (2002).
- 11) J. K. Nicholson, J. Connelly, J. C. Lindon, and E. Holmes, *Nature Rev. Drug Discov.*, **1**, 153 (2002).
- 12) J. D. Vassallo, Society of Toxicology 43rd Annual Meeting, Baltimore, March (2004).
- 13) T. Soga, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **281**, 16768 (2006).
- 14) T. Yamamoto, R. Kikkawa, H. Yamada, and I. Horii, *J. Toxicol. Sci.*, **30**, 213 (2005).
- 15) R. Kikkawa, M. Fujikawa, T. Yamamoto, Y. Hamada, H. Yamada, and I. Horii, *J. Toxicol. Sci.*, **31**, 23 (2006).

- 16) T. Soga, Y. Ohashi, Y. Ueno, H. Naraoka, M. Tomita, and T. Nishioka, *J. Proteome Res.*, **2**, 488 (2003).
- 17) ICH Harmonised Tripartite Guideline, Ethnic factors in the acceptability of foreign clinical data E5 (R1).
- 18) K. D. Wilner, *et al.*, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **79**, 84 (2006).
- 19) S. P. Myrand, *et al.*, *Clin. Pharmacol. Ther.*, in press.
- 20) M. Kimura, I. Ieiri, K. Mamiya, A. Urae, and S. Higuchi, *Ther. Drug Monit.*, **20**, 243 (1998).
- 21) S. M. De Morais, G. R. Wilkinson, J. Blaisdell, U. A. Meyer, K. Nakamura, and J. A. Goldstein, *Mol. Pharmacol.*, **46**, 594 (1994).
- 22) T. Mizutani, *Drug Metab. Rev.*, **35**, 99 (2003).
- 23) 鈴木 勉, 鈴木健夫, 坂口裕理子, *ゲノム医学*, **6**, 205 (2006).
- 24) V. Ambros, *Nature*, **431**, 350 (2004).
- 25) T. Fukushima, Y. Hamada, H. Yamada, and I. Horii, *J. Toxicol. Sci.*, **32**, 401 (2007).
- 26) Y. Tsuchiya, M. Nakajima, S. Takagi, T. Taniya, and T. Yokoi, *Cancer Res.*, **66**, 9090 (2006).
- 27) M. Stoeckli, P. Chaurand, D. E. Hallahan, and R. M. Caprioli, *Nature Med.*, **7**, 493 (2001).
- 28) Y. Sugiura, S. Shimma, and M. Setou, *Anal. Chem.*, **78**, 8227 (2006).
- 29) R. Lemaire, A. Desmons, J. C. Tabet, R. Day, M. Salzet, and I. Fournier, *J. Proteome Res.*, **6**, 1295 (2007).

Keywords: Mass spectrometry, Genome toxicology, Toxicopanomics, Toxicogenomics, Toxicoproteomics, Toxicometabonomics, Biomarker, Genotyping