

## 既承認核酸医薬品の審査報告書を読み解く

木下潔<sup>\*1,\*2</sup>, 中澤隆弘<sup>\*3</sup>, 荒戸照世<sup>\*4</sup>, 三井田宏明<sup>\*1,\*5</sup>,  
平林容子<sup>\*6</sup>, 真木一茂<sup>\*7</sup>, 吉田徳幸<sup>\*6</sup>, 井上貴雄<sup>\*6</sup>

Consideration Points for Safety Assessment Based on Review Reports of  
the Approved Oligonucleotide Therapeutics

Kiyoshi KINOSHITA<sup>\*1,\*2</sup>, Takahiro NAKAZAWA<sup>\*3</sup>, Teruyo ARATO<sup>\*4</sup>, Hiroaki MIIDA<sup>\*1,\*5</sup>,  
Yoko HIRABAYASHI<sup>\*6</sup>, Kazushige MAKI<sup>\*7</sup>, Tokuyuki YOSHIDA<sup>\*6</sup> and Takao INOUE<sup>\*6</sup>

## 1. はじめに

アンチセンスや siRNA に代表される RNA を標的とするオリゴヌクレオチド製剤(核酸医薬品)は、標的 RNA に配列特異的にハイブリダイズすることにより作用を発現する(オンターゲット作用)。核酸医薬品により生じる可能性のある毒性として、過剰な薬理作用であるオンターゲット毒性や、ハイブリダイゼーションに起因しないオフターゲット毒性(クラスエフェクトなどオリゴヌクレオチド特有の構造や物理化学的特性により生じる毒性)に加え、標的 RNA と同一もしくは類似した相補結合領域を有する RNA にハイブリダイズすることにより生じる毒性(ハイブリダイゼーションに起因するオフターゲット毒性)(Fig.

1)が考えられる。

ハイブリダイゼーションに起因するオフターゲット毒性は、核酸医薬品に特有の作用機序で生じる毒性であるため、低分子医薬品やバイオ医薬品を念頭においた既存の非臨床安全性評価ガイドライン(ICH M3(R2), ICH S6(R1)等)<sup>1,2)</sup>をもとに評価することはできないと考えられる。また、核酸医薬品は用いられている修飾核酸の種類やその配置、二本鎖形成やコンジュゲートの有無等の違いによって作用メカニズムや物性が異なるため<sup>3)</sup>、製品の特性を踏まえて既存のガイドラインを参考にしつつ、ケースバイケースで非臨床安全性を評価しているのが現状である。これまで各国/地域の様々なグループから核酸医薬品の非臨床安全性評価に関する考え方が white paper,

\*1 日本製薬工業協会 東京都中央区日本橋本町 2-3-11 (〒103-0023)

Japan Pharmaceutical Manufacturing Association (JPMA), 2-3-11 Nihonbashi-Honcho, Chiyoda-ku, Tokyo 103-0023, Japan

\*2 MSD 株式会社 東京都千代田区九段北 1-13-12 (〒102-8667)

MSD K.K., 1-13-12 Kudan-Kita, Chiyoda-ku, Tokyo 102-8667, Japan

\*3 オープンサークルパートナーズ合同会社 神戸市北区筑紫が丘 9-9-10 (〒651-1212)

Open Circle Partners, LLC, 9-9-10 Tsukushigaoka, Kita-ku, Kobe, Hyogo 651-1212, Japan

\*4 北海道大学病院 札幌市北区北 14 条西 5 丁目 (〒060-8648)

Hokkaido University Hospital, Kita 14, Nishi 5, Kita-ku, Sapporo 060-8648, Japan

\*5 第一三共株式会社 東京都江戸川区北葛西 1-16-13 (〒134-8630)

Daiichi Sankyo Co., Ltd., 1-16-13 Kitakasai, Edogawa-ku, Tokyo 134-8630, Japan.

\*6 国立医薬品食品衛生研究所 神奈川県川崎市川崎区殿町 3-25-26 (〒210-9501)

National Institute of Health Sciences, 3-25-26 Tonomachi, Kawasaki-ku, Kawasaki, Kanagawa 210-9501, Japan

\*7 独立行政法人医薬品医療機器総合機構 東京都千代田区霞が関 3-3-2 新霞ヶ関ビル (〒100-0013)

Pharmaceuticals and Medical Devices Agency (PMDA), 3-3-2 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-0013, Japan

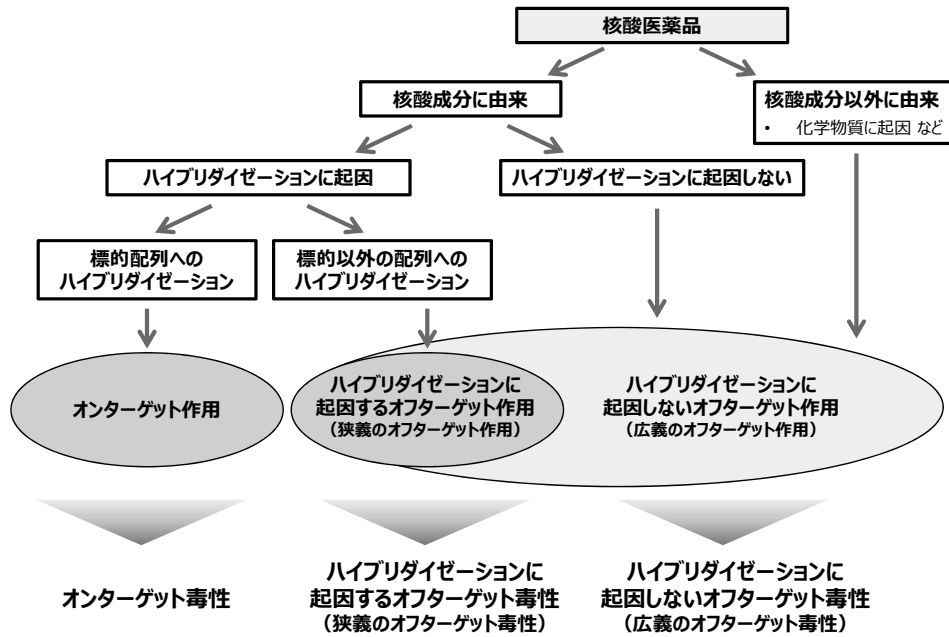


Fig. 1 核酸医薬品により生じる可能性のある毒性

point-to-consider や recommendation などとして示されてきた<sup>4~22)</sup>。更に、本邦ではこの考えを進めて「核酸医薬品の非臨床安全性評価に関するガイドライン(案)」として纏め、これに対するパブリックコメントが募集された(平成31年2月21日)<sup>23)</sup>。

このような状況下では、既承認核酸医薬品の承認申請資料や審査報告書は、新たな核酸医薬品の非臨床安全性評価を行う上で、重要なヒントをもたらすものと考えられる。なぜなら、多様な核酸医薬品について、製造販売承認に向けて申請者側の企業と日米欧の規制当局がそれぞれの非臨床安全性試験データからどのような判断を行ったかが窺われるからである。そこで、日本核酸医薬学会レギュラトリーサイエンス(RS)部会では、「既承認核酸医薬品の審査報告書を読み解く」と題して、第11回核酸医薬RSシンポジウム<sup>注1)</sup>(2019年2月13日：一橋会館)を開催した。

本シンポジウムでは、まず、既承認の核酸医薬品(Table 1)のうち、今回対象とした六つの核酸医薬品の審査報告書に書かれた毒性評価内容について四つの講演で整理した。次いで日本核酸医薬学会RS部会並びにICH S6 対応

研究班<sup>注2)</sup>のメンバーがパネリストとして登壇し、新薬承認申請時の審査において規制当局がどのような判断をしたかを読み解くと共に、個々の製品ごとに判断されたと思われる点、共通して適用できる考え方や問題点・課題点等について、参加者と共に議論した。本稿は、当日の講演内容を整理・統合した上で、パネルディスカッションでの質疑応答に対して詳しい説明を加えて纏めたものである。

## 2. 非臨床安全性試験のデータパッケージ並びに各論

2019年2月時点で日米EUにおいて承認された核酸医薬品の審査報告書を基に、実施された非臨床安全性試験内容を整理した。具体的には、既承認のうち6品目(pegaptanib, mipomersen, inotersen, nusinersen, eteplirsen, patisiran)について、安全性薬理試験、一般毒性試験、遺伝毒性試験、がん原性試験及び生殖発生毒性試験の実施内容を、実施した試験の種類、使用動物種、投与方法、最高用量、サロゲート(動物の相同遺伝子の配列を標的とした試験動物種で薬理活性を示すように設計された代替オリゴヌ

注1) 核酸医薬RSシンポジウム：核酸医薬レギュラトリーサイエンスシンポジウム。核酸医薬品の品質・安全性評価等のレギュラトリーサイエンス(RS)に関するテーマを題材に、産官学が一堂に会し、オープンに議論している。国立医薬品食品衛生研究所が2014年に立ち上げ、現在は日本核酸医薬学会RS部会が企画・運営を行っている。本シンポジウムの開催予定は、日本核酸医薬学会会員にメールにて通知されるほか、日本核酸医薬学会のホームページに掲載される(<http://nats.kenkyukai.jp/event/>)。

注2) ICH S6 対応研究班：正式名は、令和元年度日本医療研究開発機構研究費(医薬品等規制調和・評価研究事業)「医薬品の安全性及び品質確保のための医薬品規制に係る国際調和の推進に関する研究(研究代表者：平林容子)」の補助事業課題「バイオ/核酸医薬品の安全性に関する研究」遂行のための研究班。上記事業のもと、平成27年度よりこれまで、核酸医薬品で生じる可能性のある毒性を評価するための基本的な考え方を整理し、医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス誌上で順次提案してきた。

**Table 1** 既承認の核酸医薬品 (2019年11月現在)

商品名	一般名	分類	塩基長 (DDS等)	化学修飾 等	承認国/年	標的	適応	投与
Vitravene <sup>®</sup>	fomivirsen	アンチセンス	21	S化	US 1998 EU 1999	CMV IE2 mRNA	CMV 性網膜炎 (AIDS 患者)	硝子体内
Macugen <sup>®</sup>	pegaptanib	アプタマー	28 (PEG)	2'-F 2'-OMe	US 2004 EU 2006 JP 2008	VEGF165 (タンパク質)	滲出型加齢黄斑変性症	硝子体内
Kynamro <sup>®</sup>	mipomersen	アンチセンス (Gapmer)	20	S化 2'-MOE	US 2013	ApoB-100 mRNA	ホモ接合型家族性 高コレステロール血症	皮下
Exondys 51 <sup>®</sup>	eteplirsen	アンチセンス (SSO)	30	モルフォ リノ核酸	US 2016	Dystrophin pre-mRNA	デュシェンヌ型 筋ジストロフィー	静脈内
Spinraza <sup>®</sup>	nusinersen	アンチセンス (SSO)	18	S化 2'-MOE	US 2016 EU 2017 JP 2017	SMN2 pre-mRNA	脊髄性筋萎縮症	髄腔内
HEPLISAV-B <sup>®</sup>	— (CpG1018)	CpG オリゴ	22	S化	US 2017	TLR9 (タンパク質)	B 型肝炎 (予防)	筋肉内
Tegsedi <sup>®</sup>	inotersen	アンチセンス (Gapmer)	20	S化 2'-MOE	US 2018 EU 2018	TTR mRNA	遺伝性 ATTR アミロイドーシス	皮下
Onpattro <sup>®</sup>	patisiran	siRNA	21 (LNP)	2'-OMe	US 2018 EU 2018 JP 2019	TTR mRNA	遺伝性 ATTR アミロイドーシス	静脈内
Waylivra <sup>®</sup>	volanesorsen	アンチセンス (Gapmer)	20	S化 2'-MOE	EU 2019	ApoCIII mRNA	家族性高カイロミクロン 血症	皮下
Givlaari <sup>®</sup>	givosiran	siRNA	23 (GalNac)	S化 2'-OMe 2'-F	US 2019	ALAS1 mRNA	急性肝性ポルフィリン症	皮下

クレオチド)の利用等の観点から読み取り、毒性試験ごとに共通して適用できる考え方や問題点・課題点等の概略を以下にまとめた。

なお、読み解くにあたり、上記6品目のうち、pegaptanibのみRNAを標的としないアプタマーであることに注意が必要である。個々のデータパッケージの詳細については他稿<sup>24)</sup>を参照されたい。

## 2.1 安全性薬理試験

### 2.1.1 *In vivo* 試験

今回検討した全ての核酸医薬品で安全性コアバッテリー試験<sup>注3)</sup>が実施されていたが、反復投与毒性試験に組み込んで評価が行われている品目(mipomersen, nusinersen)も

あった。

Pegaptanibを除く5品目が臨床適用経路で実施されていた。Pegaptanibが静脈内投与(臨床では硝子体内投与: Table 1)で実施されたのは、十分な全身曝露下で評価するためと考えられた。Mipomersenやeteplirsenでは、ヒト以外の霊長類(Non-Human Primate: NHP)を用いて皮下と静脈内の両投与経路で実施しており、これらの試験実施時に両方の臨床適用経路が選択肢として残されていた可能性が考えられた。

### 2.1.2 *In vitro* 試験

Mipomersen及びinotersenの2品目でhERG試験<sup>注4)</sup>が実施されていた。非実施4品目のうち、pegaptanibではhERG試験についての記載がなかった。

注3) 安全性コアバッテリー試験

安全性薬理試験は、一般毒性試験等で実施される通常の観察や検査法では必ずしも十分検出できない生体機能変化を、特定の試験系により評価することを目的としている。安全性コアバッテリー試験とは、安全性薬理試験のうち生命維持機能に重要な影響を及ぼす中枢神経系、呼吸系、心血管系に対する被験化合物の影響を評価する、定型的な試験パッケージを指す。通常、GLP基準による信頼性が要求される。

注4) hERG試験

被験化合物による催不整脈作用の有無を予測するための*in vitro*試験の一つ。心室性頻脈性不整脈発生のリスクは、QT間隔(心室の脱分極から再分極までの時間を表す指標)の延長により増加する。医薬品によるQT間隔延長の最も一般的な機構は、IKrを発生させる遅延整流カリウムイオンチャネルの抑制であることから、ヒト急速活性型遅延整流カリウムチャネル遺伝子(human ether-a-go-go related gene: hERG)によりコードされたIKrチャネルタンパク質発現系を用いてイオン電流への影響を評価する。通常、GLP基準による信頼性が要求される。

モルフォリノオリゴ核酸 (PMO) で構成される eteplirsen では、他の疾患を対象に開発中である PMO アンチセンス 2 品目で hERG 試験の結果が陰性であることを引用したが、US 当局 (Food and Drug Administration : FDA) はこれらを調査対象としなかった。また、nusinersen では、同じ修飾核酸 (2'-MOE, S 化) を含む七つのアンチセンス (2'-MOE 搭載 S 化アンチセンス) が hERG に影響しないこと、大きな分子サイズを持つアンチセンスに起因するチャネル阻害の可能性が低いこと等から、hERG 試験を実施していなかった。これに対して日本当局 (医薬品医療機器総合機構, Pharmaceuticals and Medical Devices Agency : PMDA) は、他の 2'-MOE 搭載 S 化アンチセンスのデータに基づくリスク評価には限界があり、ハイブリダイゼーションに依存しないオフターゲット作用でチャネルに影響する可能性が否定できないこと、本薬の全身曝露が認められることなどから、本来であれば臨床試験開始前に実施すべきであったと述べている。siRNA を脂質ナノ粒子で封入した製剤である patisiran では、siRNA 単独ではなく、脂質ナノ粒子に封入した製剤で hERG 試験を実施した。

以上のように、hERG 試験を実施していない化合物が認められたことから、本試験実施の必要性について議論が必要と考えられた (パネルディスカッション項, Q3-5 参照)。

## 2.2 一般毒性試験

### 2.2.1 動物種及び投与経路

少なくともげっ歯類 1 種 (マウス又はラット) と非げっ歯類 1 種 (NHP) の動物種 2 種での評価が共通してみられ、いずれも ICH M3 (R2) ガイドライン<sup>1)</sup>に沿って評価されたことが窺われた。試験期間については、nusinersen の長期反復投与毒性試験が NHP のみで実施されていたことに対し、PMDA は「本来であればげっ歯類を用いた長期反復投与毒性試験も実施すべきであった」と述べている。また、原則として臨床適用経路での評価が望まれるが、げっ歯類での実施は困難として pegaptanib (臨床適用経路：硝子体内投与) 及び nusinersen (臨床適用経路：髄腔内投与) では静脈内や皮下の代替投与で評価していた。なお、非げっ歯類での評価では全品目が臨床適用経路を選択している。

### 2.2.2 オンターゲット毒性の評価

オンターゲット毒性の評価には薬理作用を示す動物種を用いた評価が必要だが、その動物種としてヒトと標的配列が同一又は類似する NHP が繁用されていた (mipomersen, inotersen, eteplirsen, patisiran の 4 品目：NHP で薬理作用を示す)。また、アプタマーとして作用する pegaptanib では、作用標的である VEGF が動物種間で高い類似性を示し、異種間での作用発現が確認されている

ことから、動物のデータをヒトに外挿可能であるとされていた。

薬理作用を示す適切な動物種のない場合の評価方法としてサロゲートが利用されていたが、試験への組み込み方には品目により違いが認められた。Mipomersen では開発候補品 (臨床試験で用いられる予定の核酸医薬品) に加え、サロゲートをマウス 6 か月の試験に 1 群追加して評価するのみであった。一方、eteplirsen ではマウスでの開発候補品の評価を 12 週間までとしたのに対し、サロゲートの評価を 26 週間まで実施していた。更に、本品目では、対象疾患 (デュシェンヌ型筋ジストロフィー) のモデル動物である mdx マウスを用いたサロゲート及び開発候補品の評価を行っていた。また、inotersen では開発候補品とサロゲートの両方を 26 週間まで評価していた。一方、patisiran では NHP が薬理作用を示したことから、ラットでのサロゲート群が設定されていなかった。

以上、開発候補品でオンターゲット毒性を評価できる種が存在するにもかかわらず、他の動物種でサロゲートを用いての評価を追加実施するかどうかは製品ごとに対応が異なっていた。また、nusinersen では標的分子である SMN2 遺伝子が毒性試験に用いられる動物種には存在しないため、これらの動物種を用いた試験でオンターゲット毒性を評価することはできないとしていた。これら品目により対応が異なっている点については、パネルディスカッションの論点となった (パネルディスカッション項, Q2-1 ~ 4 参照)。

### 2.2.3 用量と全身曝露の安全域

ヒト承認用量における全身曝露の指標である血中濃度曲線下面積 (Area Under the blood concentration time Curve : AUC) と各動物種で実施した一般毒性試験の最高用量の AUC とを比較した安全域は、いずれの品目でもおよそ数倍から 30 倍の間であった。このうち、髄腔内投与の nusinersen では、NHP の用量が臨床用量より低く設定されていたが、脳脊髄液量で補正したところ (ヒトの脳脊髄液量は NHP の約 10 倍)、安全域は数倍であった。なお、patisiran では安全域が 1 倍程度であったが、この理由を「ヒトと比較して動物では毒性に対する感受性が高かった可能性がある」としていた。

以上、用量又は全身曝露を比較したところ、いずれの化合物においても、およそ 30 倍までの安全域の範囲で試験が行われていた。

## 2.3 遺伝毒性試験

既承認の核酸医薬品は全て化学修飾が施されており、全品目で ICH S2 (R1) ガイドライン<sup>25)</sup>で定められたコアバッテリー試験、すなわち *in vivo* 遺伝毒性試験、並びに *in*

*in vitro* 遺伝毒性試験(細菌を用いた復帰突然変異試験, 哺乳類培養細胞を用いた染色体異常試験あるいはマウスリンフォーム TK 試験)が実施されていた。 *In vivo* 試験の投与経路は、可能であれば臨床適用経路、もしくは十分な全身曝露が見込める静脈内投与が選択されていた。

毒性懸念のあるオリゴヌクレオチド以外の成分があればそれらも評価する必要があるが、patisiran では製剤に加えて脂質ナノ粒子を構成する新規成分についての *in vitro* コアバッテリー試験を実施していた。また、核酸医薬品では分解物であるモノヌクレオチドが DNA に取り込まれて突然変異を誘発する可能性が考えられるが、分解物により形質転換を生じるリスクを評価していたのは pegaptanib のみであった。

## 2.4 がん原性試験

化学修飾された核酸医薬品では、ICH S1A ガイドラインに従い試験実施の要否に従い、がん原性を適宜評価することが必要と考えられている<sup>9,26)</sup>。硝子体内投与である pegaptanib は全身曝露及び薬効面からリスクが低いため実施不要とされたが、他の5品目は全て実施済又は実施中であった。

5品目のうち3品目(mipomersen, inotersen, eteplirsen)ではマウスとラットの2種を用いて評価していた。他の2品目のうち、nusinersen は、同じ修飾核酸の背景情報があること(2'-MOE 搭載 S 化アンチセンスのがん原性は mipomersen で一定の評価がされている、ただし nusinersen と mipomersen では 2'-MOE の導入部位が異なる)、オンターゲット作用が評価できないこと(標的である SMN2 遺伝子がマウス及びラットに存在しない)、げっ歯類では臨床適用経路である髄腔内投与で長期反復投与ができないこと等の理由により、初回申請時にはがん原性試験を実施していなかった。しかし、「少なくとも1種のげっ歯類を用いてがん原性を評価する必要がある」との FDA 及び PMDA からの要求に基づき、マウスのがん原性試験を実施した。また、patisiran は長期投与時に抗薬物抗体の産生に伴い全身曝露が低下するため、ラットのがん原性試験を行わず、TgrasH2 マウスを用いた半年間の評価を行っている。

原則として、げっ歯類2種でのがん原性評価が必要とされているが、構造的に類似したオリゴヌクレオチドを用いて得られた知見や対象疾患の重篤性を考慮し、1種での評価の可否やその実施タイミングについては、当局とも相談のうえ決定する必要があることが窺われた。

## 2.5 生殖発生毒性試験

Eteplirsen では、適用疾患のデュシェンヌ型筋ジストロ

フィー患者がほぼ男性のため、一連の生殖発生毒性試験を実施していなかった。しかし、他の5品目では、背景データの集積された動物種を用いて原則 ICH S5 (R2)<sup>27)</sup> ガイドラインに従い試験を実施していた。受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験、出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験(PPND 試験)ではともにげっ歯類1種が、胚・胎児発生に関する試験についてはげっ歯類とウサギの2種が用いられていた。なお、適用疾患の加齢黄斑変性症患者が高齢であるとして、pegaptanib では PPND 試験を実施していない。

Mipomersen, inotersen, patisiran の生殖発生毒性試験では、薬理作用が認められないげっ歯類及びウサギが用いられており、開発候補品に加えてサロゲート群を設定した試験が実施されていた。このように、生殖発生毒性試験におけるオンターゲット作用を評価する上での動物種選択については、対応が分かれていたため、パネルディスカッションの論点となった(パネルディスカッション項、Q2-5 参照)。

## 3. 毒性評価戦略

### 3.1 ハイブリダイゼーションに起因する オフターゲット作用の検出と評価

ハイブリダイゼーションに起因するオフターゲット作用(オフターゲット効果)を、動物もしくは動物由来の試料を用いた試験により検出することは困難である。そのため、核酸医薬品の配列設計を行う際には、十分なオンターゲット活性を確保するとともに、ヒト RNA データベースやヒト細胞等を用いた解析によりオフターゲット効果の低減が図られる。オフターゲット効果は RNA とのハイブリダイゼーションに起因して起こる現象であるため、「オリゴヌクレオチドとハイブリダイゼーションしうる RNA」が発現変動の影響を受ける可能性がある。したがって、オフターゲット効果を生じる可能性のある遺伝子(=オフターゲット候補遺伝子)を選別するには、ヒト RNA データベースを対象とした *in silico* 解析によりオリゴヌクレオチドと相補性のある遺伝子を抽出する手法が有用である<sup>28)</sup>。どの程度相補性のある遺伝子がオフターゲット効果の影響を受けるかについては、ヒト細胞を用いて遺伝子発現変動を評価する *in vitro* 解析が有用である<sup>29)</sup>。ヒトにおいてオフターゲット効果の予測されるオフターゲット候補遺伝子については、リスク評価を行った上で臨床でのリスク管理を適切に行うことが推奨されている (Fig. 2)。

アンチセンス3品目(mipomersen, inotersen, nusinersen)及び siRNA1 品目(patisiran)について、審査報告書から読み取ることのできたオフターゲット候補遺伝子の検出や

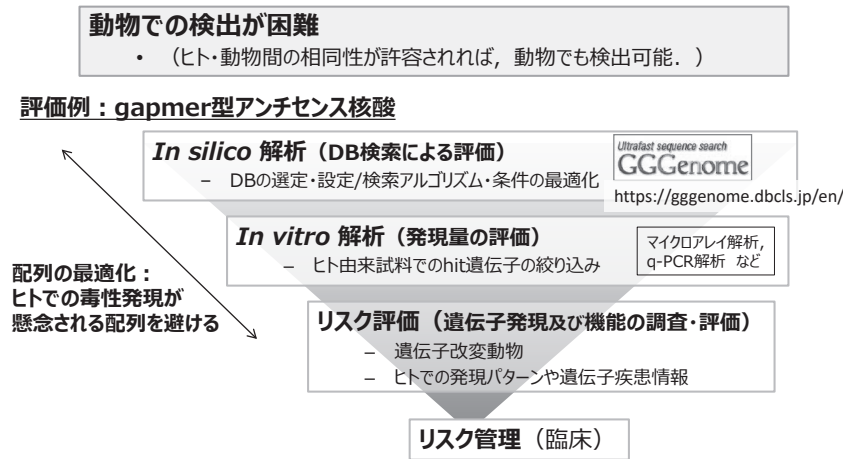
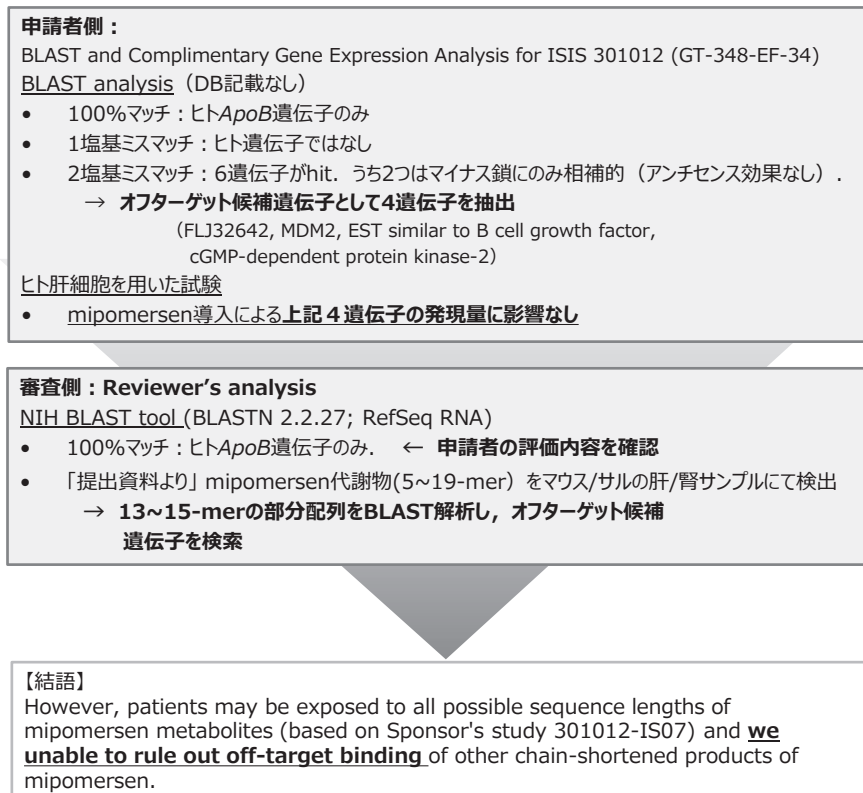


Fig. 2 ハイブリダイゼーション依存的オフターゲット作用

絞り込みの現状を纏めた (Fig. 3～6). *in silico* 解析では、完全一致からアンチセンスでは最大3 mismatchesまで、siRNAでは最大5 mismatchesまでの配列を解析していた。また、nusinersenのケースではPMDAより「配列内部の mismatches, インサート及びギャップを考慮して検討すべ

き」との要請がみられ、オフターゲット候補遺伝子の絞り込みについても、一定の基準が示されていた。これらの絞り込みの基準等については、パネルディスカッションの論点となった (パネルディスカッション項, Q1-1~4 参照)。



[出典]

The Center for Drug Evaluation and Research (CDER), FDA  
 - CLINICAL PHARMACOLOGY AND BIOPHARMACEUTICS REVIEW(S)  
 (https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\_docs/nda/2013/203568Orig1s000ClinPharmR.pdf)  
 - PHARMACOLOGY REVIEW(S)  
 (https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\_docs/nda/2013/203568Orig1s000PharmR.pdf)

Fig. 3 オフターゲット候補遺伝子の絞り込み：Mipomersen

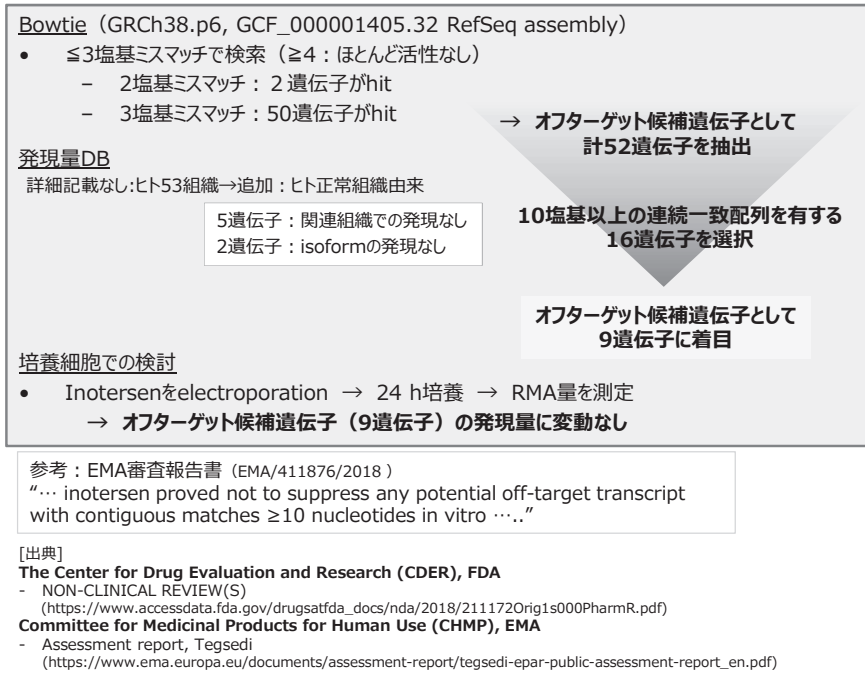
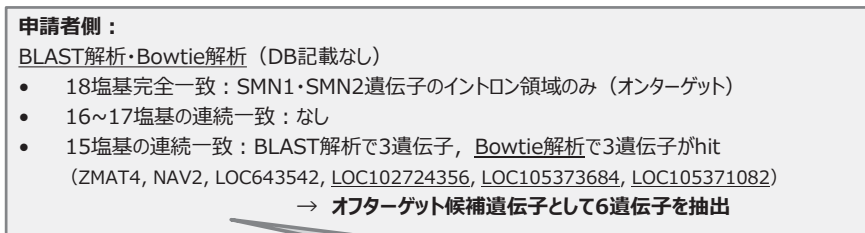
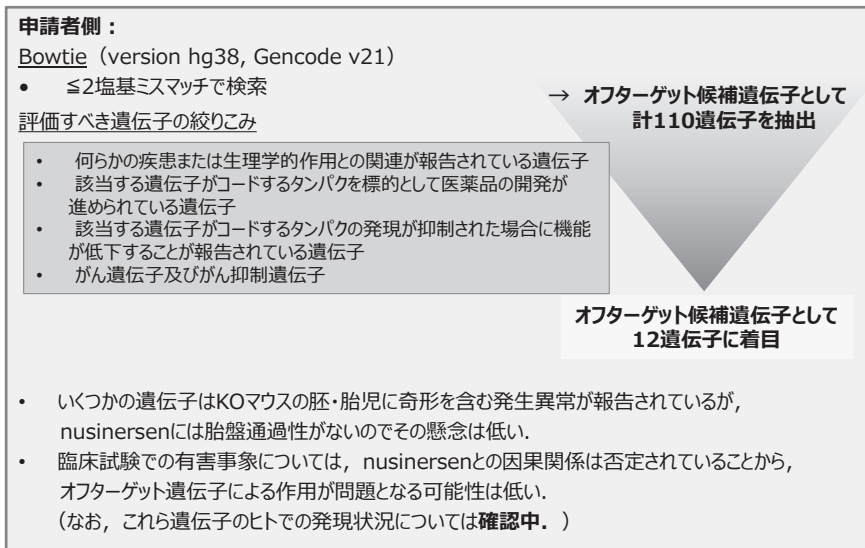


Fig. 4 オフターゲット候補遺伝子の絞り込み：Inotersen



【審査の過程において】  
連続15塩基以上での相同性だけでなく、配列内部のミス  
マッチ、インサート及びギャップを考慮して、検討すべきでは？



[出典]  
独立行政法人医薬品医療機器総合機構  
- 審査報告書/審査結果報告書 他  
([http://www.pmda.go.jp/drugs/2017/P20171013001/630499000\\_22900AMX00587\\_A100\\_1.pdf](http://www.pmda.go.jp/drugs/2017/P20171013001/630499000_22900AMX00587_A100_1.pdf))  
([http://www.pmda.go.jp/drugs/2017/P20170731001/630499000\\_22900AMX00587\\_A100\\_2.pdf](http://www.pmda.go.jp/drugs/2017/P20170731001/630499000_22900AMX00587_A100_2.pdf))  
(<http://www.pmda.go.jp/drugs/2017/P20170731001/index.html>)

Fig. 5 オフターゲット候補遺伝子の絞り込み：Nusinersen

(詳細記載なし)

- 3～5塩基ミスマッチ  
→ オフターゲット候補遺伝子として7遺伝子を抽出
- (候補遺伝子を) transfectしたHepB3細胞を用いて評価  
→ patisiranによる活性はTTR (on target) の1/1000未満

FDA審査報告書：NDA 210922 - Patisiran - Cross-Discipline Team Leader Review  
 “... Seven potential off-target human transcripts were identified, possessing between 3 and 5 base mismatches compared to the target sequence on the TTR gene; however, in vitro assays in transfected HepB3 cells indicated that the affinity of ALN-18328 for each potential transcript was less than 1000-fold than that for TTR. ...”

EMA審査報告書：EMA/554262/2018  
 “... Potential off-target mRNAs similar to TTR mRNA were identified through bioinformatics analysis, but no clear in-vitro suppression of their expression was measured when tested...”

[出典]  
 The Center for Drug Evaluation and Research (CDER), FDA  
 - MULTI-DISCIPLINE REVIEW  
 (https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\_docs/nda/2018/210922Orig1s000MultiR.pdf)  
 Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), EMA  
 - Assessment report, Onpatro  
 (https://www.ema.europa.eu/documents/assessment-report/onpatro-epar-public-assessment-report\_.pdf)

Fig. 6 オフターゲット候補遺伝子の絞り込み：Patisiran

### 3.2 動物種の選択とサロゲートの利用

核酸医薬品の毒性試験に使用する動物種選択においては、オンターゲット毒性とオフターゲット毒性を評価できるように、原則としてげっ歯類及び非げっ歯類の2種の動物種を選択する。ハイブリダイゼーションに起因しないオフターゲット毒性はこれらの動物種で検出できると考えられる。ハイブリダイゼーションに起因しないオフターゲット毒性には、オリゴヌクレオチドに共通の作用によって生じるクラスエフェクトが含まれると考えられる<sup>8)</sup>。クラスエフェクトの評価について、同一又はきわめて類似性の高い化学修飾を施された他のオリゴヌクレオチドの毒性情報を一般化して(しばしば「プラットフォームアプローチ」と呼ばれる)、何らかの試験を省略することは現時点では難しいと考えられる。

「2. 非臨床安全性試験のデータパッケージ並びに各論」項で述べたように、オンターゲット毒性の評価には薬理作用を示す動物種を用いる必要がある。しかし、核酸医薬品

は標的特異性が高く、結果として種特異性が高いものが多いため、通常毒性試験で用いる動物種の中に薬理作用を示す動物種が見つからないことがある。この場合、毒性試験動物種で薬理作用を示すサロゲートを使用するという選択肢があるが、サロゲートを用いた毒性試験には、①開発候補品とは異なる分子である、②ハザード(有害性)の確認でありリスクアセスメントには適さない、③開発候補品の安全域の算出ができない、④サロゲートの毒性所見にはオンターゲット毒性とオフターゲット毒性が混合している、⑤開発候補品とサロゲートではオフターゲット毒性の強さや質が異なるなどの課題が知られている。サロゲートを使用していた品目について、Table 2に纏めた(局所投与のアプタマーである pegaptanib は除いた)。興味深い点として、生殖発生毒性試験では積極的にサロゲートを利用しようという姿勢がみられた。

Table 2 既承認核酸医薬品の安全性評価におけるサロゲートの使用状況

品目		NHP	マウス	ラット	ウサギ
mipomersen	一般毒性試験	CC	CC	CC	—
	生殖発生毒性試験	—	CC + S (F + EFD)	CC + S (PPND)	CC + S (EFD)
	がん原性試験	—	CC + S	CC + S	—
eteplisen	一般毒性試験	CC	CC + S	CC	—
	生殖発生毒性試験	—	—	—	—
	がん原性試験	—	CC (Tg, rasH2)	CC	—
inotersen	一般毒性試験	CC	CC + S	CC + S	—
	生殖発生毒性試験	—	CC + S (F + EFD, PPND)	—	CC (EFD)
	がん原性試験	—	CC (Tg, rasH2)	CC	—
patisiran	一般毒性試験	CC	—	CC	—
	生殖発生毒性試験	—	—	CC + S (F + EFD, PPND)	CC + S (EFD)
	がん原性試験	—	CC (Tg, rasH2)	—	—

CC：開発候補品，S：サロゲート，NHP：ヒト以外の類人猿，F：受胎能試験，EFD：胚・胎児発生に関する試験，PPND：出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

## 4. パネルディスカッション

ハイブリダイゼーションに起因するオフターゲット作用の検出、サロゲートの使用を含む動物種の選択、その他(試験デザイン、既存の試験法の妥当性など)、講演内容に関連した幅広い課題についての質疑応答並びにフロアを交えた議論が行われた。本稿の冒頭で述べたように、近年の核酸医薬品開発の進展は著しいものの、その非臨床安全性評価については開発候補品の特徴を踏まえたケースバイケースで進められているのが現状である。

本パネルディスカッションでは、各課題に対して複数の視点からの議論が行われたので、それらの考えを以下に纏めた。

### 4.1 ハイブリダイゼーションに起因する オフターゲット作用についての課題

**Q1-1** ハイブリダイゼーションに起因するオフターゲット作用の評価にあたり *in silico* 解析で留意すべき点は何か？

**A1-1** 当該 *in silico* 解析を実施する際には、まず開発するオリゴヌクレオチドの特性を踏まえて、適切なデータベース及び検索アルゴリズムを選択する必要がある。データベースの選択の際には、データの種類、質、量及び信頼性等を考慮したうえで、可能であれば最新のデータベースの利用を検討する必要がある。一方、検索アルゴリズムについては、BLAST などではミスマッチやギャップが複数あるような短い塩基配列を見落とす可能性が報告されていることから<sup>30)</sup>、できるだけ当該懸念が少ない検索アルゴリズム(例：GGGenome, <https://gggenome.dbcls.jp/ja/>)を選択する必要がある。その上で、開発するオリゴヌクレオチドの特性を考慮した検索条件(例えば、ミスマッチ数、Tm 値、各パラメータの重み付け)を検討することになる。更に siRNA については、シード配列とよばれる 7 塩基ほどの短い配列が相補結合するだけで、切断活性を示すことが知られていることから、このような特定の核酸医薬品に特化した検索アルゴリズム(例：siDirect など)を検討することも必要になろう。

**Q1-2** *In silico* 解析は、開発段階のどの時点で実施することが適切か？

**A1-2** ヒトと動物ではゲノム配列が異なることから、動物を用いた毒性試験での評価には限界がある。そのため、ハイブリダイゼーションに起因するオフターゲット作用については、初回臨床試験開始前までには評価しておく必要がある。実際には、核酸医薬品の設計段階で当該作用につ

いては評価されているものと考えられるが、その際には有効性のみならず、安全性の観点から *in silico* 解析や *in vitro* 解析等に基づき塩基配列を最適化することが望ましい。

**Q1-3** *In silico* 解析では、多くのオフターゲット(候補)遺伝子が得られる可能性があるが、それら全ての遺伝子について評価を行う必要があるのか？

**A1-3-1** まず、オフターゲット候補遺伝子を抽出するための基準や手法について考えてみたい。「オフターゲット候補遺伝子」はオリゴヌクレオチドと RNA との相補性に基づいて抽出されるものなので、ミスマッチをどこまで許容するかなどによりその数は大きく変動する。したがって、「どの程度の相補性のある遺伝子をオフターゲット候補遺伝子とすべきか」については、当該オリゴヌクレオチドの作用機序、塩基長、修飾核酸の種類等を考慮しながら、適切な科学的根拠に基づいて、個別に基準を設定する必要がある。具体的にはヒト細胞を用いた *in vitro* の系で、臨床開発品の相補性の程度と遺伝子発現変動の関連を解析することで、オフターゲット候補遺伝子を抽出するための基準を得ることができると考えられる。

オフターゲット候補遺伝子はあくまで“候補”遺伝子であり、実際にオフターゲット効果の影響を受けるか否かを *in silico* 解析のみで正確に予測することは難しい。例えば、*in silico* 解析で 1 塩基ミスマッチを有する遺伝子でも、*in vitro* 解析で遺伝子の発現変動の影響を受けない遺伝子もあり、このような遺伝子のリスクは低いと考えられる。

このような背景から、*in silico* 解析で得られた全てのオフターゲット候補遺伝子について、一律に評価するのではなく、ヒト細胞を用いた *in vitro* 解析で実際に発現変動の影響を受けるオフターゲット候補遺伝子(=オフターゲット遺伝子)について、その影響を評価する方法が考えられる。

オフターゲット遺伝子のリスク評価については、まずは現時点で明らかになっている生理的機能(循環器系、呼吸器系、中枢神経系、生殖発生毒性、がん原性等)に基づいて判断することになるが、注意すべきことは、多くの分子の遺伝子機能の解析が現在も進行中であることである。例えば、現状では機能未知なものであっても、今後の研究により重要な生理機能が見つかる遺伝子が出てくることも考えられる。したがって、安全性担保の観点から考えると、オフターゲット効果の影響を強く受けるが現時点では、情報が乏しい遺伝子については、リスクに関連した情報出現を把握する努力を継続することが望ましいと考える。

**Q1-4** オフターゲット候補遺伝子については、最終的にどのような評価をいつ実施する必要があるのか？

**A1-4** 評価方法については、ヒト由来細胞等を用いた *in vitro* での発現解析など様々なものが考えられる。更に、当該オフターゲット候補遺伝子の生物学的特性などの背景情報を踏まえて、総合的にヒトでのリスク評価を検討することになる。

オフターゲット候補遺伝子の評価の実施時期については、少なくとも初回臨床試験開始前には、主要な生理的機能(例えば、循環器系、呼吸器系、中枢神経系)に関連するオフターゲット候補遺伝子の有無とそのリスクを確認する必要がある。当該リスクが懸念される場合には、*in vitro* での発現解析等を踏まえた詳細なリスク評価が必要である。これらの結果、ヒトへの安全性が懸念されるようであれば、治験実施時のモニタリングや予測される副作用の軽減策等のリスクマネジメントに関する方策、被験者及び治験実施者に対するリスクコミュニケーションを十分に検討した上で、治験開始の適切性を慎重に検討する必要がある。

一方、主要な生理的機能以外のオフターゲット候補遺伝子(例えば、生殖発生毒性、がん原性等に関わる遺伝子)については、必ずしも初回臨床試験開始前までに評価する必要はないと考えられる。

## 4.2 サロゲート使用を含む動物種選択についての課題

**Q2-1** 核酸医薬品の毒性試験における動物種選択について、考慮すべき点は何か？

**A2-1** 化学合成医薬品やバイオ医薬品と同様に、原則としてげっ歯類と非げっ歯類の動物種2種を用いる必要があると考える。核酸医薬品のオフターゲット毒性評価のためには、開発候補品を用い、動物種2種で毒性試験を実施する。その際、オンターゲット毒性を評価するため、開発候補品に対して薬理作用を示す動物種が少なくとも1種必要である。もし、開発候補品に対して薬理作用を示す適切な動物種が得られない場合には、サロゲートを用いた評価を検討すべきである。

しかしながら、サロゲートを用いる目的はオンターゲット作用に起因するハザード(有害性)の同定であるため、開発候補品を用いた動物種1種での毒性試験において、1用量(高用量)のサロゲート群を設定し、オンターゲット毒性を評価することが適切と考えられる。

**Q2-2** オンターゲット毒性が評価できる動物種が1種得られる場合、他の動物種でのサロゲートを用いた非臨床安全性評価は必要か？

**A2-2** 開発候補品に対して薬理作用を示す動物種が1種ある場合、他の動物種でのサロゲートを用いた非臨床安全性評価は必ずしも必要ないとする。

今回調査した mipomersen, eteplirsen 及び inotersen では、これらの核酸医薬品に対して薬理作用を示す NHP での各開発候補品を用いた反復投与毒性試験に加え、マウスでのサロゲートを用いた毒性試験が実施されていた。更に、inotersen ではサロゲートを用いたラットでの毒性試験が実施されていた。しかしながら、NHP において薬理作用が認められる patisiran では、NHP での開発候補品を用いた試験のみが実施され、サロゲートを用いた試験を実施していなかった。これらの品目ではいずれも製造販売承認されていることから、薬理作用を示す動物種が1種でも得られる場合には、サロゲートを用いた非臨床安全性評価は承認要件ではないと考えられる。

**Q2-3** 薬理作用を示す適切な動物種が得られない場合、サロゲートを用いた毒性試験は必須か？

**A2-3** 核酸医薬品のオンターゲット毒性の評価は必須であることから、サロゲートを用いた非臨床安全性評価を考慮する必要がある。しかしながら、標的分子が試験動物種に存在しない場合には対応が異なる。例えば、今回調査した nusinersen では、標的分子である SMN2 は毒性試験に用いられる動物種には存在しないため、申請者側はサロゲートを作製できないと説明し、PMDA はこの説明を受け入れ、代わりにオンターゲット毒性に関係するヒトでの安全性を製造販売後に調査することを条件として了承している。

**Q2-4** オンターゲット毒性の評価を免除されるケースはあるのか？

**A2-4** 開発候補品に対して薬理作用を示す動物種が得られず、かつオンターゲット作用が発現しても生体機能に重大な影響を及ぼすことが懸念されない場合には、非臨床試験でオンターゲット毒性を評価する必要性は乏しいと考えられる。

**Q2-5** 開発候補品を用いた NHP での非臨床安全性試験が実施可能な場合であっても、NHP を用いた試験を回避するために、開発候補品ではなくサロゲートを用いた毒性試験を選択するという考え方について意見を訊きたい。

**A2-5** 開発候補品とサロゲートでは塩基配列が異なるため、ヒトでの安全性評価が適切に評価できない懸念があること、またサロゲートを用いた非臨床安全性試験の目的はハザード評価であり、量的なリスク評価の実施が困難であることから、一般毒性試験においてはサロゲートではなく、開発候補品を用いた評価を優先することが適切と考えられる。

ただし、生殖発生毒性試験においては、使用動物数、個体間のバラツキ、高い流産率、背景データ等の観点から、げっ歯類やウサギに比べ、NHP は適切な動物種とはいえないことから、サロゲートを用いた評価が優先されると考えられる。今回の調査では、mipomersen, inotersen 及び patisiran では、NHP を用いた生殖発生毒性試験は実施されず、サロゲートでのげっ歯類又はウサギを用いた生殖発生毒性試験が実施されていた。また、patisiran では、開発候補品での反復投与毒性試験には NHP を、また、サロゲートでの生殖発生毒性試験にはげっ歯類又はウサギを用いた試験を実施しており、当該見解と一致している。

**Q2-6** 開発候補品とサロゲートで毒性所見が異なる場合、どう解釈するか？

**A2-6** 例えば、inotersen はヒトと NHP で薬理活性が認められるが、げっ歯類では活性を示さない。Inotersen を用いたマウス、ラット及び NHP に対する毒性試験では血小板減少が認められたものの、サロゲートを用いたマウス及びラットに対する毒性試験では当該所見は認められなかった。これらの結果について、申請者はサロゲートの所見を踏まえて、inotersen でみられた血小板減少はオンターゲット作用に起因するものではないと解釈していた。

一方、もし、毒性所見が逆であった場合(すなわち、サロゲートのみである毒性が観察された場合)には、結果の解釈は複雑になり、サロゲートのみで観察された毒性が、過剰な薬理作用(すなわち、オンターゲット毒性)に起因するものか、サロゲート自体のオフターゲット毒性に起因するものなのかを判断することは困難となる。このように、サロゲートを用いた非臨床安全性評価では、試験結果によって毒性学的な解釈が困難になる懸念があることに留意する必要がある。

### 4.3 その他

**Q3-1** 反復投与毒性試験の最高用量について、曝露量ベースでは、化学合成医薬品では臨床曝露量の 50 倍、またバイオ医薬品では最大薬理作用を考慮して 10 倍とされているが、核酸医薬品についてはどのように考えれば良いか？

**A3-2** 核酸医薬品の非臨床安全性評価では、ハイブリダイゼーションに起因するオンターゲット毒性はバイオ医薬品の、また、ハイブリダイゼーションに起因しないオフターゲット毒性は化学合成医薬品の非臨床安全性評価の考え方がそれぞれ参考になるが、反復投与毒性試験の最高用量においては、どちらか高い用量を設定すべきであることから、通常、化学合成医薬品に準じた考え方、すなわち、ICH M3 (R2) ガイドライン<sup>1)</sup>に記載されている臨床曝露量の 50 倍、最大耐量 (MTD)、投与可能な最大用量 (MFD)、曝露の飽和が起る用量等を参考に設定することになると考えられる。

**Q3-2** 同じ化学修飾を有する他の核酸医薬品での非臨床安全性データが得られている場合、新たに開発する核酸医薬品においても、オフターゲット毒性の評価のために 2 種の動物種での試験が必要か？

**A3-2** 現時点では、同じ化学修飾が施された他の核酸医薬品の非臨床安全性データが得られている場合でも、原則として、オフターゲット毒性の評価のために動物種を 2 種選択する必要がある。今回調査した 6 品目では、全てげっ歯類と非げっ歯類での試験が実施されていた。これは、同じ化学修飾が施された核酸医薬品であっても、配列が異なれば毒性プロファイルが異なることが知られているため、「低分子化合物と同様に、オフターゲット毒性が発現するか否かを 1 種の動物で予測することが困難である」という前提に立っているからと考えられる。

**Q3-3** 短期毒性試験を動物種 2 種で実施したうえで、長期毒性試験を 1 種のみで実施することは可能か？

**A3-3** Nusinersen の審査報告書には、「非げっ歯類 (NHP) の長期毒性試験に加え、げっ歯類 (マウス) でも長期毒性試験が必要か」という点について、PMDA と申請者との議論が記載されている。本品目では反復投与毒性試験として、NHP では 14 週間及び 53 週間の髄腔内投与試験が実施されているが、げっ歯類 (マウス) では 13 週間の皮下投与試験のみが実施され、長期投与試験は実施されていない。申請者は、nusinersen を用いたマウスと NHP に対する毒性試験では、他の 2'-MOE 搭載 S 化アンチセンスによる毒性プロファイルとの類似が認められることか

ら、マウスを用いた長期毒性試験成績は予測できると主張した。しかしながら、PMDAは、2'-MOE修飾アンチセンスでの毒性所見を一般化して、配列の異なる他の品目を用いた試験を省略することは適切でないとし、nusinersenもNHPに加えてマウスを用いた動物種2種での長期毒性試験を実施すべきであったと主張した(nusinersenの対象疾患が致死性の高い重篤な疾患であるため患者に提供することは許容された)。なお、FDAもnusinersenの審査報告書において類似の判断を示している。

**Q3-4** ハイブリダイゼーションに起因しないオリゴヌクレオチドに共通の作用であるクラスエフェクトと考えられる毒性所見はどの程度、一般化できるか？

**A3-4** 核酸医薬品のクラスエフェクトとしては、Toll様受容体(TLR)を介した自然免疫等に起因する影響、血小板減少症、肝及び腎毒性等が報告されているが、毒性プロファイルについては動物種によって異なること<sup>24)</sup>、また、特定のコンセンサス配列を有するオリゴヌクレオチドによって惹起される肝毒性なども報告されていること<sup>31)</sup>などから、個々の品目においてヒトでのリスクを評価する必要があると考えられる。

**Q3-5** 化学合成される核酸医薬品では、化学合成医薬品と同様に、安全性薬理コアバッテリーを評価する上で、hERG試験が必要か？

**A3-5** hERG電流を阻害する低分子化合物は、細胞外から細胞内に取り込まれ、hERGチャンネル内腔に結合することによりカリウムイオン電流を抑制すると考えられる。しかしながら、hERG試験系にはヌクレアーゼなどが含まれていないため、高分子量でかつ負電荷を有する核酸医薬品がhERGチャンネルの機能を阻害する可能性は低いと考えられる。したがって、hERG試験は基本的には必須ではなく、毒性試験や臨床試験において心血管系への影響が認められた際に、その作用機序を検討するためなど、必要であれば実施するので良いと考えられる。

**Q3-6** 化学合成医薬品では、通常、がん原性試験は動物種2種(マウス、ラット)を用いて実施されるが、nusinersenでは動物種1種(マウス)のみでの評価で許容されている。核酸医薬品のがん原性試験における動物種選択の考え方について教えてほしい。

**A3-6** 核酸医薬品については、化学合成医薬品と同様に、ICH S1Aガイドライン<sup>26)</sup>に準じてがん原性試験実施の必要性を検討し、必要な場合には、原則として動物種2種(マウス、ラット)を用いたがん原性試験の実施を検討することになる。Nusinersenについては、適応症が重篤

で致死性の高い乳児型の脊髄性筋萎縮症であったこと、臨床適用経路である髄腔内投与に起因する試験実施が困難であること、2'-MOE搭載S化アンチセンスのがん原性については一定の評価がなされていること等が考慮され、ICH M3(R2)ガイドライン<sup>1)</sup>に準じて製造販売承認申請時にはがん原性試験が必要とされず、マウス1種の皮下投与でのがん原性試験を速やかに実施することで製造販売承認されている。

## 5. おわりに

本邦では、2019年2月に「核酸医薬品の非臨床安全性評価に関するガイドライン(案)」<sup>23)</sup>が公開され、パブリックコメントが募集された。本ガイドライン(案)は、ICHガイドライン化に向けた礎とするべく、ICH S6(R1)ガイドライン<sup>2)</sup>に倣い、核酸医薬品の安全性評価に対する全般的な考え方の指針を示すものとしてまとめられた。一方、核酸医薬品開発の進展は著しいが、評価の前例や知識・経験の蓄積はまだ十分とはいえない。このため、当該ガイドラインの確定版が発出されたとしても、その運用にあたっては製品の特性を踏まえた「ケースバイケース」の基本理念に沿って、より安全な医薬品開発に向けた評価を進めることが肝要である。

本稿は、核酸医薬品の非臨床安全性評価における「ケースバイケース」のヒントとすべく、既承認品目の審査報告書等から読み取れる情報をもとに「第11回核酸医薬RSシンポジウム」で議論した内容をまとめたものである。現在、開発を進めている品目の「ケースバイケース」の評価について判断しかねる場合にはPMDA相談を活用するなど、開発側・審査側ともに適切な議論を積極的に重ね、科学的根拠に基づく経験を共有していくことが、きわめて重要と考えられる。

## 文 献

- 1) 厚生労働省医薬食品局審査管理課長。「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス」について。薬食審査発0219第4号、平成22年2月19日。
- 2) 厚生労働省医薬食品局審査管理課長。「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」について。薬食審査発0323第1号、平成24年3月23日。
- 3) 井上貴雄他。核酸医薬品の開発動向と規制整備の現状。Pharm Tech Japan. 2019, 35(13), p2533-2545。
- 4) ICH S6 対応研究班。SERIES核酸医薬の非臨床安全性を考える(1)連載の開始にあたって。医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス。2015, 46(5), p286-289。
- 5) ICH S6 対応研究班。SERIES核酸医薬の非臨床安全性を考える(2)サロゲートを用いた毒性試験。医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス。2015, 46(6), p374-379。
- 6) ICH S6 対応研究班。SERIES核酸医薬の非臨床安全性を

- 考える (3)核酸医薬品に由来する代謝物の評価, 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 2015, 46 (8), p.523-527.
- 7) ICH S6 対応研究班. SERIES 核酸医薬の非臨床安全性を考える (4)核酸医薬品のオフターゲット作用の評価, 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 2015, 46 (10), p.681-686.
  - 8) ICH S6 対応研究班. SERIES 核酸医薬の非臨床安全性を考える (5)核酸医薬品のクラスエフェクトの評価, 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 2015, 46 (12), p.846-851.
  - 9) ICH S6 対応研究班. SERIES 核酸医薬の非臨床安全性を考える (6)核酸医薬の非臨床安全性試験における動物種選択, 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 2016, 47 (2), p.101-104.
  - 10) ICH S6 対応研究班. SERIES 核酸医薬の非臨床安全性を考える (7)核酸医薬の遺伝毒性評価, 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 2016, 47 (4), p.250-253.
  - 11) ICH S6 対応研究班. SERIES 核酸医薬の非臨床安全性を考える (8)核酸医薬の生殖発生毒性試験, 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 2016, 47 (8), p.568-574.
  - 12) ICH S6 対応研究班. SERIES 核酸医薬の非臨床安全性を考える (9)試験デザインやその他の試験, 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 2016, 47 (10), p.724-729.
  - 13) Schubert, D.; Levin, AA.; Kornbrust, D.; Berman, CL.; Cavagnaro, J.; Henry, S.; Seguin, R.; Ferrari, N.; Shrewsbury, SB. The Oligonucleotide Safety Working Group (OSWG). 2012, *Nucleic Acid Ther.* 22 (4), p.211-212.
  - 14) Capald, D.; Ackley, K.; Brooks, D.; Carmody, J.; Draper, K.; Kambhampati, R.; Kretschmer, M.; Levin, D.; McArdle, J.; Noll, B.; Raghavachari, R.; Roymoulik, I.; P (Bob) Sharma, BP.; Thürmer, R.; Wincott, F. Quality Aspects of Oligonucleotide Drug Development: Specifications for Active Pharmaceutical Ingredients (API). *Therapeutic Innovation & Regulatory Science.* 2012, 46 (5), p.611-626.
  - 15) Alton, EW.; Boushey, HA.; Garn, H.; Green, FH.; Hodges, M.; Martin, RJ.; Murdoch, RD.; Renz, H.; Shrewsbury, SB.; Seguin, R.; Johnson, G.; Parry, JD.; Tepper, J.; Renzi, P.; Cavagnaro, J.; Ferrari, N. Clinical expert panel on monitoring potential lung toxicity of inhaled oligonucleotides: consensus points and recommendations. *Nucleic Acid Ther.* 2012, 22 (4), p.246-254.
  - 16) Kornbrust, D.; Cavagnaro, J.; Levin, A.; Foy, J.; Pavco, P.; Gamba-Vitalo, C.; Guimond, A. Oligo safety working group exaggerated pharmacology subcommittee consensus document. *Nucleic Acid Ther.* 2013, 23 (1), p.21-28.
  - 17) Berman, C.; Cannon, K.; Cui, Y.; Kornbrust, DJ.; Lagrutta, A.; Sun, SZ.; Tepper, J.; Waldron, G.; Younis, HS. Recommendations for safety pharmacology evaluations of oligonucleotide-based therapeutics. *Nucleic Acid Ther.* 2014, 24 (4), p.291-301.
  - 18) Lindow, M.; Vornlocher, HP.; Riley, D.; Kornbrust, DJ.; Burchard, J.; Whiteley, LO.; Kamens, J.; Thompson, JD.; Nochur, S.; Younis, H.; Bartz, S.; Parry, J.; Ferrari, N.; Henry, SP.; Levin, AA. Assessing unintended hybridization-induced biological effects of oligonucleotides. *Nat Biotechnol.* 2012, 30 (10), p.920-923.
  - 19) Cavagnaro, J.; Berman, C.; Kornbrust, D.; White, T.; Campion, S.; Henry, S. Considerations for assessment of reproductive and developmental toxicity of oligonucleotide-based therapeutics. *Nucleic Acid Ther.* 2014, 24 (5), p.313-325.
  - 20) Berman, CL.; Barros, SA.; Galloway, SM.; Kasper, P.; Oleson, FB.; Priestley, CC.; Sweder, KS.; Schlosser, MJ.; Sobol, Z. OSWG Recommendations for Genotoxicity Testing of Novel Oligonucleotide-Based Therapeutics. *Nucleic Acid Ther.* 2016, 26 (2), p.73-85.
  - 21) Marlowe, JL.; Akopian, V.; Karmali, P.; Kornbrust, D.; Lockridge, J.; Semple S. Recommendations of the oligonucleotide safety working group's formulated oligonucleotide subcommittee for the safety assessment of formulated oligonucleotide-based therapeutics. *Nucleic Acid Ther.* 2017 27 (4), p.183-196.
  - 22) EMEA. 2005. CHMP SWP Reflection paper on the assessment of the genotoxic potential of antisense oligodeoxynucleotides. London. 2005.
  - 23) 厚生労働省医薬・生活衛生局医薬品審査管理課. 核酸医薬品の非臨床安全性評価に関するガイドライン(案). 平成 31 年 2 月 21 日.
  - 24) 上野圭仁, 真木一茂, 荒戸照世. 核酸医薬品の非臨床安全性試験の現状. 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 2019, 50 (2), p.72-82.
  - 25) 厚生労働省医薬食品局審査管理課長. 医薬品の遺伝毒性試験及び解釈に関するガイダンスについて, 薬食審査発 0920 第 2 号, 平成 24 年 9 月 20 日.
  - 26) 厚生省薬務局審査課長. 医薬品におけるがん原性試験の必要性に関するガイダンスについて. 薬審第 315 号, 平成 9 年 4 月 14 日.
  - 27) 厚生省薬務局審査課長. 医薬品の生殖発生毒性試験に係るガイドラインの改定について. 薬審第 316 号, 平成 9 年 4 月 14 日. (一部改正, 厚生省医薬安全局審査管理課長, 医薬品の生殖発生毒性試験についてのガイドラインの改正について, 医薬審第 1834 号, 平成 12 年 12 月 27 日.)
  - 28) Yoshida, T.; Naito, Y.; Sasaki, K.; Uchida, E.; Sato, Y.; Naito, M.; Kawanishi, T.; Obika, S.; Inoue, T. Estimated number of off-target candidate sites for antisense oligonucleotides in human mRNA sequences. *Genes to Cells.* 2018, 23 (6), p.448-455.
  - 29) Yoshida, T.; Naito, Y.; Yasuhara, H.; Sasaki, K.; Kawaji, H.; Kawai, J.; Naito, M.; Okuda, H.; Obika, S.; Inoue, T. Evaluation of off-target effects of gapmer antisense oligonucleotides using human cells. *Genes Cells.* 2019, 24 (12) p.827-835. doi:10.1111/gtc.12730.
  - 30) 内藤雄樹. 核酸医薬のオフターゲット効果をインシリコに予測する. 実験医学, 2019, 37 (1), p.47-53.
  - 31) Burdick, AD.; Sciabola, S.; Mantena, SR.; Hollingshead, BD.; Stanton, R.; Warneke, JA.; Zeng, M.; Martsen, E.; Medvedev, A.; Makarov, SS.; Reed, LA.; Davis, JW.; Whiteley, LO., Sequence motifs associated with hepatotoxicity of locked nucleic acid-modified antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* 2014, 42 (8), p.4882-4891.