

アドメノート

レギュラトリーサイエンスにおける 薬物動態研究の役割(第3回) 医薬品代謝物の安全性評価の動向

株式会社大塚製薬工場
内藤真策



1. はじめに

世界における創薬産業は、主に三極(米国, EU, 日本)と称される地域において盛んであり、これらの地域の産業界代表と医薬品規制当局とが協力してICH (International Conference on

Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 日米EU医薬品規制調和国際会議)等の枠組みの中で共通の安全性評価の基盤を形成し、安全で有効な新薬が創出されてきた。医薬品は、開発段階での毒性研究あるいは薬物動態研究からの安全性評価と基礎研究と臨床研究での有効性評価が合わさって、新薬の適正な価値がデータにより示されている。更には、価値に見合った価格により市場に供給され、その利益が明日の創薬の促進となっている。

このような医薬品開発の循環の中で、安全性評価の役割は、新薬の価値を明確にする基準として重要と考えられる。医薬品開発における実験動物やヒト試料を用いた非臨床試験から得られる薬物動態に関する多くの情報は、臨床での副作用(毒性)や薬理作用の発現機構を明らかにするため、また、適切な製剤設計や臨床での投与方法の設定のために重要である。しかし、薬物動態には種差、個体差(個人差)があり、さらに、薬物代謝活性は種々の因子により影響される。そのため、動物とヒトを比較した薬物動態の情報は、毒性試験や薬理試験の結果をヒトに外挿し有効性や安全性を判断する上で、また、薬理作用の個人差や感受性の高い患者さんを評価する場合や、薬物相互作用の予測にも役立ってきた。ただし、代謝物がヒトと大きく異なる動物種での結果の解釈は注意を要すると思われる。

【用語解説】

代謝物(Metabolite)：親化合物から第I相反応または第II相反応の代謝経路により生成される化合物。

抱合代謝物(Conjugate)：薬物等の外来物質(異物)や体内由来の一部物質(ホルモン, 胆汁酸, ビリルビン等)に他の親水性分子(硫酸, グルクロン酸, グルタチオン等)が

付加された代謝物。

活性代謝物(Pharmacologically active metabolite)：親化合物と同様もしくは異なる薬理学的効果を有する代謝物。

反応性代謝物(Reactive metabolite)：薬物の代謝過程で生成する化学的に不安定な中間代謝物。

ヒト特異的代謝物(Unique human metabolite)：ヒト血液循環系に存在するヒトでのみ認められる代謝物。

主要代謝物(Major metabolite)：FDAのMISTガイダンスでは、「ヒトで投与量あるいは全身曝露量(どちらか少ない方)の10%を超える代謝物」と定義されている。

Disproportionate drug metabolite：FDAのMISTガイダンスで定義され、「不均衡性代謝物」のような意味合いを持つ。ヒトでのみ存在する代謝物、もしくは非臨床試験で用いられた安全性評価動物よりヒトにおける曝露量が明らかに高い代謝物。

2. 医薬品代謝物のレギュラトリーサイエンス

医薬品代謝物の安全性評価について、本邦では、まず、通知¹⁾およびICH-1²⁾において、主要代謝物の毒性や薬理作用に関する情報の必要性が示された。一方、安全性評価を行うべき代謝物の生成量は言及されず、また代謝物の安全性評価方法は三極においてケースバイケースの判断に委ねられていた。その後、米国では、米国食品医薬品局(FDA)と米国研究製薬工業協会(PhRMA)により安全性を評価すべき代謝物に関して、未変化体と代謝物を合わせた総曝露量に対する個々の代謝物の割合等が議論された³⁻⁵⁾。これらも踏まえ、本邦の規制当局から個人的な見解として、ヒト特異的な代謝物の毒性学的評価の考え方が提示された⁶⁾。また、日本製薬工業協会(製薬協)の調査では代謝物の毒性試験に高い関心がうかがえた⁷⁾。2007年に開催された医薬品評価フォーラムのキックオフミーティングでは基礎から臨床まで産学官が一堂に介して医薬品の代謝物の非臨床安全性評価について議論し、画期的新薬を目指した⁸⁾。

一方、2005年にFDAから代謝物の安全性評価に関するドラフトガイダンスが示され、2008年2月にはSafety Testing of Drug Metabolites⁹⁾として通称「MISTガイダンス」が公開され、臨床試験で認められた代謝物の安全性試験の考え方が提示された。ヒト特異的、またはヒトで動物より多く生成し、一般的に、定常状態での曲線下面積(AUC)で測定される親化合物の全身曝露量に対して、その10%を超える血漿中代謝物が対象となり、安全性評価が必要とされ、その実施時期や方法が示された。

2010年2月に、ICH M3(R2)の合意に基づき、本邦では「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」¹⁰⁾がstep 5となり、代謝物の安全性評価に関する一般的な考え方が提示

された。ICH M3(R2)では、総曝露量に対する代謝物の曝露量を基準とすることが三極の規制要件としてハーモナイズされたものの、具体的な試験方法ではなく概略の提示となった。そのため、創薬研究においては、続いて公開されたICH M3(R2) Q&As step 4¹¹⁾を参照し、さらに規制当局との協議あるいはMISTガイダンスや過去の事例を参考に代謝物が評価されていると推察された。また、製薬協のアンケート調査(2010年)から示された医薬品開発における代謝物の安全性評価に向けた取り組みに関する論文では、臨床での安全性に配慮しながら有用性の高い医薬品をいち早く創出するための効率的なヒト代謝物の評価について示された¹²⁾。

3. 薬物代謝酵素と問題点

生体に投与された薬物は、有効性を示すと共に、多くの場合、肝臓を中心とした各種臓器において、薬物代謝に関連する酵素で代謝を受けて排泄される。薬物代謝酵素には遺伝的要因による人種差、個人差、性差等が存在し、これらの酵素の一部は、病態をはじめ併用薬、年齢および喫煙や飲食物等の環境要因により影響を受け、その程度も個人により異なると考えられる。さらに、医薬品等の化合物や生理的な内因性物質による酵素誘導等の酵素量の変動も明らかとなっている。そのため、これらの遺伝的要因と環境要因は複合的な影響としてヒトにおける代謝物の安全性評価を行う上で大きな課題となる。

医療現場で発生する副作用や有害事象が、いわゆる反応性代謝物と関連する場合も考えられる。しかし、反応性代謝物は代謝過程の中間体として存在し、速やかに安定な代謝物あるいはタンパク質等との共有結合体の産生へと変化しやすく、反応性代謝物の検出や安定な合成標品の供給は難しい。そのため、反応性代謝物の存在を証明し毒性発現機序を解明し、一般的な考え方を形成するには大きな困難を伴う。また、親化合物を用いた動物実験から代謝物を評価できるが、代謝過程に量的あるいは速度的な種差を認めた場合や、ヒト特異的代謝物や反応性代謝物などが生成された場合の取り組みはケースバイケースの対応となる。

我々が取り扱った化合物、OT-7100 (5-n-butyl-7-(3,4,5-trimethoxybenzoylamino)pyrazolo[1,5-a]pyrimidine)について、動物とヒトの代謝の相違、あるいは反応性代謝物の生成について図1に示す。この化合物は末梢神経性疼痛抑制作用を有するピラゾロピリミジン誘導体である。OT-7100はラットおよびイヌでは生体内での毒性所見は見いだされなかったが、臨床ステージにおいて長期投与された場合、ASTおよびALTの上昇などの肝機能障害例が認められた。

OT-7100はM-5に加水分解代謝された後、ヒトCYP1A2によってM-23OHのみに代謝される。一方、ラ

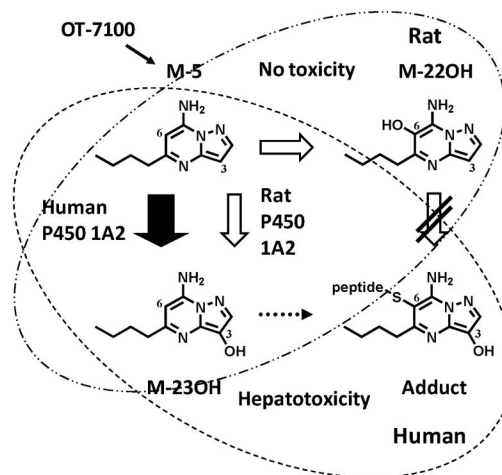


図1 ヒトとラットのOT-7100の代謝の種差と反応性代謝物の生成

ットCYP1A2ではM-23OHおよびM-22OHに代謝される。また、M-5の代謝過程において観察される肝ミクロソームタンパク質との共有結合はラットよりもヒトが高値を示し、グルタチオンの添加によって減少した¹³⁾。その共有結合タンパク種は非特異的であった¹⁴⁾。

従って、ヒトにのみ発現した肝機能傷害は特異的な代謝物が生成したのではなく、ヒトとラットにおけるCYP1A2の機能の違いによりM-23OHから生成するキノイミン体が反応性代謝物となり、タンパク質との共有結合によるものと考えられた。CYP1A酵素の基質特異性は、ヒトと実験動物で比較的共通と考えられるが、OT-7100のように代謝量の種差の原因となり反応性代謝物の生成を伴う場合もある。

次に、高脂血症治療薬で見られた代謝経路の種差について示す。Ibrolipim (Diethyl 4-[(4-bromo-2-cyanophenyl) carbamoyl]benzylphosphonate)はLPLを活性化することによりHDLコレステロールを上昇させ、血漿中トリグリセリド値を低下させる作用を持つ。この化合物は、非臨床試験から肝臓でのリン酸エステルのO-脱エチル化反応に加えてラットの血漿中でアミド加水分解が認められた。そこで、肝臓および血漿試料を用いた*in vitro*実験により代謝の種差について検討した。

Ibrolipimの肝S9で生成した代謝物の90%以上はM-2であり、O-脱エチル化が主代謝経路であった。また、イヌ、サルおよびヒトはラットと異なり、血漿中ではIbrolipimが加水分解されないことから、*in vivo*におけるアミド加水分解はラットに比べると少ないものと推察された。図2にIbrolipimの推定代謝経路を示す¹⁵⁾。このように、動物種によって主代謝経路が異なり、薬物動態を把握する上での動物種選択の重要性が示唆された。

なお、M-2にはLPL活性化作用は認められず、ラットおよびイスにおける反復投与において、毒性・副作用はほとんど認められないことから、主代謝物は安全性の高いものと推測された。

血漿中代謝物に種差を認めた場合を図3に示す。ピラゾロトリアジン誘導体であるBOF-4272((±)-8-(3-methoxy-4-phenylsulfinylphenyl) pyrazolo [1,5-a]-1,3,5-triazine-4(1H)-one)は高尿酸血症治療作用として尿酸の

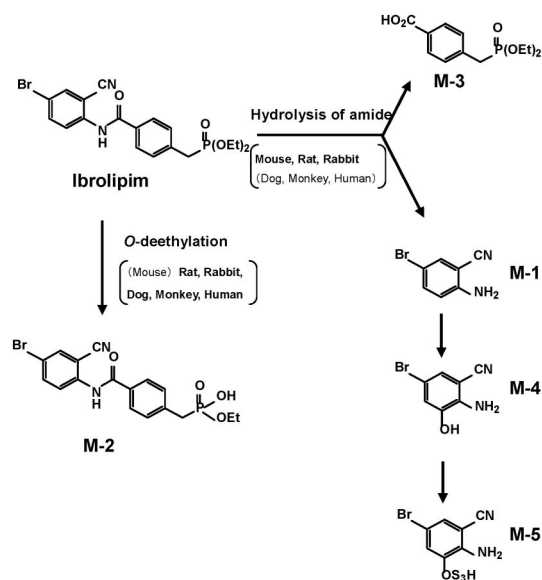


図2 Ibroloipimの主代謝経路の種差

de novo 生合成を抑制する。ラットにBOF-4272を経口投与するとBOF-4269が主代謝物として血漿中に認められ、BOF-4272から腸内細菌による還元代謝でBOF-4269が生成していた。また、BOF-4269のようなスルフィド体は肝臓でスルホキシド体のBOF-4272(親化合物)に酸化代謝され、BOF-4272は肝臓でスルホン体BOF-4276に代謝される。ラットにBOF-4272を静脈内投与した場合はM-4が胆汁中に認められたが、経口投与した場合の血漿中にM-4は検出されなかった¹⁶⁾。

一方、ヒトでは、M-4が血漿中の主代謝物であり、糞中にはM-5を認めた。

BOF-4272の投与による血漿中の主代謝物はラットとヒトで異なるものの、胆汁中・糞中での代謝物を合わせて推測すると、代謝プロファイルは類似している。したがって腸内細菌の関与と代謝物の胆汁/血漿中の振り分けが循環血液系中代謝物の表現系に種差を与えていると推測された。

4. 代謝物の安全性評価の取り組み

ICH M3(R2)では、ヒト特異的な代謝物や反応性代謝物など毒性学的な懸念がある代謝物を除き、通常、ヒトでみられた代謝物を非臨床試験で特徴付ける必要がある場合として、その代謝物の臨床での曝露量が投与薬物に関連する総ての物質の曝露量の10%を超え、かつ、ヒトにおける曝露量が非臨床安全性試験での最大曝露量よりも明らかに高い場合とされた。この「明らかに高い」という文言は統計学的な有意性ではなく、動物での曝露評価では(平均の)AUCで2倍以上の差に意味があると考えられてい

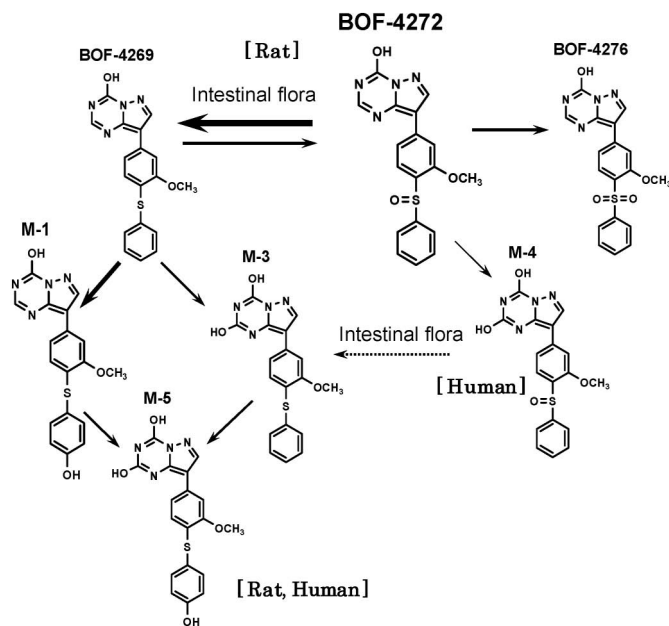


図3 BOF-4272の代謝経路の種差

る¹¹⁾。したがって、動物での曝露量がヒトの曝露量の少なくとも50%ある場合は、代謝物の毒性の評価は十分に行われていると一般的には考えられる。非臨床試験で特徴付けるべき代謝物を確認した場合には、当該代謝物の安全性評価のための非臨床試験を第Ⅲ相試験の前に実施すべきとされている。また、臨床での1日投与量が10 mg未満の場合は投与薬物に関連する総ての物質の曝露量に対する代謝物の割合を10%よりも高く設定することが適切であると言及している¹⁰⁾。

ICH M3 (R2) ガイダンスに示された10%の判断基準については、ヒトで放射性標識体 (RI) を用いた試験が考えられ、本邦にその基準はないものの、最近の申請品目の多くに RI を用いたヒトマスバランスデータが提出されている。また、非標識体での臨床試験で代謝物の一斉分析からも、ICH M3 (R2) ガイダンスに示された「投与薬物に関連する総ての物質の曝露量」が求まり、個々の代謝物の割合は算定できる。

代謝物の安全性評価では、代謝物の生成速度からの代謝安定性、代謝プロファイルの検討、さらに代謝物の曝露量等について、ヒトと実験動物を比較する。基本的な考え方としては、①動物で認められない代謝物がヒトで生じている場合、②ヒトと動物の代謝物の生成割合が異なり、ヒトで多く生成する代謝物がある場合(動物試験における投与量から安全性を担保できない場合)、③薬理作用や毒性が極めて強いと考えられる代謝物が生じる場合、などに代謝物の安全性の確認が必要であると考えられる。一方、当該代謝物が既知の物質であり、安全性プロファイルが明らかの場合や当該代謝物に薬理活性がないと判断される場合、体内における生成量や曝露量が極めて低いと考えられる場合には、代謝物を用いた安全性の確認が不要な場合もある。

ただし、ヒト特異的な代謝物や親化合物に比べて著しく強い毒性を示す代謝物が生成された場合の情報は極めて少なく、創薬・開発過程でドロップアウトの可能性を含めて、今後の調査が必要と考えられる。

5. 非臨床試験の実施時期

医薬品開発を行う上で、非臨床試験の実施のタイミングは重要である。初めてヒトに投与 (First in Human および第Ⅰ相臨床試験) する前では、探索段階として代謝安定性や活性代謝物のスクリーニングを行い、代謝物毒性の懸念の少ないものを選択することが理想である。また、ヒトとマウス、ラット、イヌ、サル等から得た肝 S9、肝ミクロソーム、肝細胞、肝スライス等の試料を用いた *in vitro* 代謝試験により、代謝プロファイルの確認を行い、代謝の種差の検討し、さらに LC-MS/MS のフラグメント分析、LC-NMR 等を用いた代謝物検索を実施する。その結果を基に、ヒトの代謝との類似性(代謝物生成、代謝速度)を考

慮して、非臨床安全性試験に使用する動物種を決定することが望ましい。また、毒性回避の目的で反応性代謝物のスクリーニングを行い、その生成のリスクを最小限に抑えるように化合物を選択することも有益である。例えば、ヒト肝ミクロソームを用い、時間依存的 CYP 阻害反応、還元型グルタチオンなどの捕捉剤を用いた定性的なトラッピングアッセイと GSH アダクト構造解析、未変化体あるいは代謝物の RI を用いたタンパク等高分子への共有結合量の測定を実施することも有用である。しかし、臨床での有害事象と反応性代謝物の関連を推定することはなかなか難しい問題であり臨床での情報にも十分に注意する。

血中濃度等の曝露を考えると、ヒトの代謝物は、ヒトに投与して初めて明らかになると言える。第Ⅰ相臨床試験では、ヒト試料(血漿、尿)さらに必要に応じて糞試料を用いてヒト代謝物の検索および構造推定を行うこととなる。最も重要なことはヒトの主要代謝物を検索し、ヒト特異的な代謝物の存在の有無を確認することであり、その後、代謝物の化学構造を親化合物と比較して毒性を推定する。

必要に応じて、代謝物の血漿中濃度推移を分析することも重要である。なお、これらの分析試験では結果を入手するまでに時間を要する場合もあり、また、分析対象の代謝物は特性分析を行った合成標品の準備が必要なため、臨床試験と分離して別試験とすることも考えられる。

ヒトにおいて代謝物が関与する毒性が強く懸念される場合には、大規模臨床試験 (Phase Ⅲ) 開始前までに代謝物の安全性に関する情報を精査しておく必要があると考えられる。FDA の MIST ガイダンスでも第Ⅲ相臨床試験までに代謝物の安全性評価に関する情報の提供が求められているが、毒性学的に問題となるヒト特異的な代謝物が認められた場合には、第Ⅱ相臨床試験の前までに代謝物の安全性を動物で確認する。また、可能なら POC (Proof of Concept) の確保のための臨床試験に向けて、代謝物の曝露評価を含むヒト RI 試験の実施を考慮したい。

申請までには、ヒト主要代謝物についての代謝酵素および代謝経路の推定、構造の推定または同定、ヒトおよび動物での血中曝露の確認、薬理活性の推定、ヒト特異的であるか否かの確認と対応が必要である。

さらに、市販後(新薬発売後)調査においては、医療現場での医薬品の有効性、安全性の確認とともに、市販前(治験)では得られなかった医薬品の適正使用についての情報の収集を注意深く行う必要がある。特に、新薬の上市後に報告された重篤な有害事象のなかには、その可能性を示唆する非臨床試験および臨床試験成績が既に存在していた場合もある。そこで、臨床現場で認められた有害事象については、公表されていない成績および申請時に注目されていない成績についての関連性も精査する必要があると考えられる。

6. 代謝物の非臨床安全性評価方法における課題

代謝物の安全性を評価するために安全性試験の実施が必要となる場合がある。しかし、代謝物投与の動物試験において親化合物の臨床投与経路で投与しても十分な曝露量が得られない場合や、静脈内投与しても一過性の曝露しか得られない場合もあるので、投与経路、投与量、投与回数等を変更する等の曝露量を大きくする工夫も必要となる。一方、血液循環系での曝露がみられたとしても、血漿タンパク結合、膜透過性またはトランスポーターへの親和性等に関連して組織移行性が変化すると、標的毒性部位の組織における曝露量が低下し、毒性を過小評価する恐れがある。さらに、抱合代謝物を動物に投与しても、懸念される反応性代謝物の毒性は評価できない可能性がある。また、技術的な問題として、反応性代謝物やグルクロン酸抱合体等の化学合成は困難な場合が多く、代謝物の合成標準品を用意できないこともある。このような試験実施上の問題点を考慮した上で、代謝物の安全性評価が可能な試験を実施する。場合によっては、*in silico*による化学構造データベースからの予測やヒト代謝系を組み込んだ *in vitro* 試験等も含めて、代謝物の毒性プロファイルを総合的に判断する。ただし、代謝物の安全性評価は複雑な要因を考慮する必要があるため、たとえ代謝物の安全性試験が不要と判断される場合であっても、十分な説明が必要となる。

7. ま と め

医薬品開発の中では、代謝物のプロファイリング、薬理活性スクリーニング等を通じてヒトでの安全性を予測し、臨床薬物動態試験と、さらにヒト RI 試験等の情報も加えて代謝物に関する安全性を評価しており、また、必要に応じて代謝物標品を用いた安全性試験を計画する。本邦では、ICH M3 (R2) ガイダンス¹⁰⁾あるいは M3 (R2) Q&As¹¹⁾を根拠に、FDA の MIST ガイダンス⁹⁾を参照し、代謝物に関する安全性試験を実施することになる。

臨床試験で得られたヒト試料を用いて代謝物を分析し、ヒト特異的代謝物が主要代謝物であるかなどを判断することは極めて重要である。しかし、代謝物標品の準備を含め、これらの研究は医薬品開発の律速となることもあり、薬のリスクとベネフィットを考え、場合により医薬品医療機器総合機構 (PMDA) の各種相談制度等を活用して最善の方法を選択すべきものと考えている。臨床試験でヒト特異的または主要代謝物が認められても、単回投与試験の場合も多く、非臨床での安全性試験と比較して投与量が少ないことや少数例で短期の臨床試験から安全性が示されている場合が多いことから、ヒトでの代謝物の安全性が確認されたとは必ずしも考えられない。しかも市販後は多数の患者さんに使用され、長期投与が行われる症例もある。本来の安

全性試験の意義は、毒性プロファイルを明らかにして、投与量を高く設定すると共に投与期間も十分に確保した上で、ヒトでの安全性を推定することにある。また、医薬品開発の過程では、臨床第 I 相試験が終わった頃にヒト代謝物のプロファイルが判明することが多いため、代謝物の情報によっては開発のスローダウンもありえる。

一方、反応性代謝物は臨床で問題となっても通常の毒性試験で確認できないことが多く、ヒト試料を使ったスクリーニング系等でチェックし、代謝物の反応性に関する情報を動物と比較して検討することを考慮する。

臨床の側面から考えると、軽視されがちなデータでもヒトで起こった事象の中に重要な問題が潜む場合があり、医療現場で出た問題を見逃さないことが重要と思われる。頻度の低い臨床での問題を非臨床でカバーできるか、また、臨床の情報をいかに基礎研究にフィードバックするか、これらを踏まえて臨床でのリスクをいかに軽減するかが課題となる。当然であるが、毒性試験により安全性が評価された化合物が医薬品として医療現場に供給される一方、市販後の臨床で問題が起きる背景には、医薬品開発で想定している条件と医療現場での条件がかなり異なっていることも考えられる。そこで、医療現場での情報を医薬品開発にフィードバックすることにより、例えば使用法の改良等に反映させることも考えられる。しかしながら、実際に問題が起きている割合は非常に少なく、非臨床において簡単に発見できるような問題ではないかもしれない。したがって、問題が起こった時点で、できるだけ迅速な対応により解決の方向性を見出すことが重要ではないだろうか。

このように考えてくると、医薬品代謝物の安全性評価は大きな課題であり、ひとつの理論的枠組みでの判断は困難であり、有用な医薬品をなるべく早く開発するために基本的にはケースバイケース的な対応が必要となる。ある程度の柔軟性を含めた考え方が医薬品開発に役に立つとも思われる。代謝物の安全性を的確に評価して、臨床試験において親化合物から予測できない副作用や代謝物に起因すると考えられる症状も考慮しながら、代謝物の正確なプロファイルを把握する必要がある。また、代謝物の安全性評価については科学的に無意味な試験は省くことにより、良質な医薬品を医療の現場に速やかに提供することが重要と考える。

最後に、本稿は、ICH 等の規制要件、産学官の議論あるいは製薬協基礎研究部会の報告と我々の研究事例に基づき、レギュラトリーサイエンスの面からまとめた。本稿を作成するに当たりご協力を頂きました関係者の皆様に感謝致します。

参考文献

- 1) 新医薬品の製造(輸入)承認申請に際しての留意事項について

- て(昭和50年3月28日薬審第526号).
- 2) Ohno, Y.: Toxicity testing: Regulatory Perspectives. Proceedings of The First International Conference on Harmonisation, 1991 Nov., Brussels, Belgium, D'Arcy, P. F. D. and Harron, D. W. G., eds., The Queen's University of Belfast, 186-188 (1992).
 - 3) Baillie, T. A., Cayen, M. N., Fouda, H., Gerson, R. J., Green, J. D., Grossman, S. J., Klunk, L. J., LeBlanc, B., Perkins, D. G. and Shipley, L. A.: Drug metabolites in safety testing. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **182**: 188-196 (2002).
 - 4) Hastings, K. L., El-Hage, J., Jacobs, A., Leighton, J., Morse, D. and Osterberg, R. E.: Letter to the Editor. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **190**: 91-92 (2003).
 - 5) Baillie, T. A., Cayen, M. N., Fouda, H., Gerson, R. J., Green, J. D., Grossman, S. J., Klunk, L. J., LeBlanc, B., Perkins, D. G. and Shipley, L. A.: Reply. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **190**: 93-94 (2003).
 - 6) 毒性 Q&A (問16 : ヒトに特異的な代謝物の毒性学的評価), 医薬品研究, **34**: 794-795 (2003).
 - 7) 井上忠志, 原田喜充, 古田盛, 河村泰仁, 栗原厚, 黒川美佐男, 中澤隆弘, 佐神文郎: 非臨床試験資料の審査において申請者側が抱える問題意識—製薬協アンケート調査結果の解析—. 医薬品研究, **36**: 388-397 (2005).
 - 8) Naito, S., Furuta, S., Yoshida, T., Kitada, M., Fueki, O., Unno, T., Ohno, Y., Onodera, H., Kawamura, N., Kurokawa, M., Sagami, F., Shinoda, K., Nakazawa, T. and Yamazaki, T.: Current Opinion: Safety Evaluation of Drug Metabolites in the Development of Pharmaceuticals. *J. Toxicol. Sci.*, **32**: 329-341 (2007).
 - 9) Guidance for Industry, Safety Testing of Drug Metabolites, FDA, CEDR, Published in Federal Register, February (2008).
 - 10) 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(薬食審査発0219第4号平成22年2月19日).
 - 11) Questions and answers on the 'Guidance on Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals (ICH M3(R2))', Step 4.
 - 12) 古田盛, 河島浩輔, 竹川晃司, 岩佐隆史, 皆川俊哉, 湊宏一, 三浦慎一, 古賀利久, 佐藤隆, 内藤真策, 中村和市: 医薬品開発における代謝物の安全性評価に向けた取り組みに関する提言. 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, **42**: 902-909 (2011).
 - 13) Kuribayashi, S., Goto, K., Naito, S., Kamataki, T. and Yamazaki, H.: Human cytochrome P450 1A2 involvement in the formation of reactive metabolites from a species-specific hepatotoxic pyrazolopyrimidine derivative, 5-*n*-butyl-7-(3,4,5-trimethoxybenzoylamino) pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine. *Chem. Res. Toxicol.*, **22**: 323-331 (2009).
 - 14) Yamazaki, H., Kuribayashi, S., Inoue, T., Tateno, C., Nishikura, Y., Oofusa, K., Harada, D., Naito, S., Horie, T. and Ohta, S.: Approach for in vivo protein-bindings of 5-*n*-butyl-pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine bioactivated in chimeric mice with humanized liver by two-dimensional electrophoresis with accelerator mass spectrometry. *Chem. Res. Toxicol.*, **23**: 152-158 (2010).
 - 15) Morioka, Y., Nishimura, M., Imai, T., Suzuki, S., Harada, M., Satoh, T. and Naito, S.: Assessment of induction of cytochrome P450 by NO-1886 (Ibrolipim), a lipoprotein lipase-promoting agent, in primary cultures of human hepatocytes and in female rat liver. *Drug Metab. Pharmacokin.*, **21**: 19-28 (2006).
 - 16) Naito, S. and Nishimura, M.: Pharmacokinetics and Proposed Metabolic Pathways of BOF-4272, a Sulfoxide-Containing Drug, Based on In-vivo and In-vitro Studies in Rats. *Pharm Pharmacol. Commun.*, **5**: 123-131 (1999).