

厚生科学研究費補助金

医薬安全総合研究事業

医薬品等の品質規格に係る  
国際的動向を踏まえた評価に関する研究

平成13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 早 川 堯 夫

平成14 (2002) 年 4月

# 目 次

I. 総括研究報告	
医薬品等の品質規格に係る国際的動向を踏まえた評価に関する研究	1
早川 堯 夫	
II. 分担研究報告	
1. 細胞・組織加工医薬品の品質や安全性確保のための試験法や基準に ついての国際動向の研究	80
山口 照 英	
2. 遺伝子治療用医薬品の品質・安全性確保に関する国際的動向に関する研究	92
—レトロウイルスベクターに混入する増殖性レトロウイルス検出法の検討—	
内 田 恵理子	
3. バイオテクノロジー医薬品の製造法の変更時の品質確保の考え方	109
—欧州におけるバイオ医薬品の同等性/同質性評価—	
川 西 徹	
(資料)	
① Production and Quality Control of Monoclonal Antibodies (CPMP 1995.7)	
② Criteria for Investigation of the Product Equivalence of Monoclonal Antibodies for Therapeutic and <i>in vivo</i> Diagnostic use in Case of Introduction of Changes in the Manufacturing Process. <i>Biologicals</i> , 23, 253-259 (1995)	
③ Points to Consider in the Manufacture and Testing of Monoclonal Antibody Products for Human Use (FDA 1997.2)	
④ Note for Guidance on Comparability of Medicinal Products Containing Biotechnology-derived Proteins as Drug Substance (CPMP 2002.3)	
⑤ One product, One Process, One Set of Specifications. A Proven Quality Paradigm for the Safety and Efficacy of Biologic Drugs. <i>BioPharm</i> , March, 14-24 (2001)	
⑥ Politics and Policies. Changes in Congress may affect Medicare coverage of biotech therapies, FDA regulations, and interest in generic biologics. <i>BioPharm</i> , July, 46-50 (2001)	
4. 特性・品質解析、品質評価法の検討	230
川 崎 ナ ナ	
5. 医薬品等の品質規格に係る国際的動向を踏まえた評価に関する研究	252
新 見 伸 吾	
6. 安定性試験における品質確保基準に関する研究	265
吉 岡 澄 江	
(資料) ① ICH Q1E Step 2 Evaluation of Stability Data (2002.2)	
7. 不純物の安全性確認に関する Q&A の作成	286
小 嶋 茂 雄	

8. 新しい品質規格を用いた製品の評価法 .....	297
豊島 聰	
9. 医薬品等の品質規格に係る国際的動向を踏まえた評価に関する研究 .....	306
新しい品質評価基準の公定規格への反映－薬局方国際調和－	
武田 寧	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....	313
IV. 研究成果の刊行物・別刷 .....	316

## 医薬品等の品質規格に係る国際的動向を踏まえた評価に関する研究

主任研究者 早川 堯夫 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部長

細胞、組織を利用した先端技術応用医薬品を含む、新医薬品等の品質及び安全性確保基準、製造管理技術及び品質確保技術について、外国での進捗状況を調査すると共に、外国の技術水準に留意した科学的に妥当性のある品質・安全性確保基準や製造管理技術・品質確保技術の確立、検証及び評価に関する以下の研究を行った。

1) ヒト由来細胞を用いた細胞・組織加工医薬品等の品質や安全性確保のための試験法や基準の設定、規制のあり方について、主として EU の最新情報を基に検討し、品質、安全性確保方策についてのわが国や FDA のガイドラインとの相違点及び今後の検討課題を明らかにした。

2) 遺伝子治療用医薬品の品質・安全性確保のための国際的共通研究課題である、レトロウイルスベクターに混入する増殖性レトロウイルス検出法を検討した。Infectivity RT-PCR とポリエチレンイミン結合磁気ビーズによる新規ウイルス濃縮法の組み合わせにより、従来法より短時間で高感度に RCR の検出が可能であることを明らかにした。

3) バイオテクノロジー医薬品の製造法の変更時の同等性/同質性評価の科学的アプローチについて、欧米、特に欧州での最新情報や文献、および欧米の専門家との意見交換を基に検討し、現時点での主要な論点を明らかにするとともに、我が国における同等性/同質性評価の要件をまとめた。

4) 生物薬品の特性・品質解析、品質評価法を検討し、液体クロマトグラフィー質量分析法を用いた糖鎖マッピング及び糖ペプチドマッピングは、糖鎖の構造とその分布の違いに基づく糖蛋白質の差異の識別、差異の原因となる糖鎖構造の解析、糖鎖の結合部位を明らかにできることから、糖タンパク質性医薬品における同等性/同質性評価法として有用であることを明らかにした。

5) 医薬品の品質確保技術の国際調和を目指した研究の一環として、生物薬品の統一力価試験法と標準物質の確立方策について検討した。具体例としてヒトトロポモジュリンについて検討し、他の生物薬品等にも一般に適用できる共通の留意事項を明らかにした。

6) 安定性試験データの解析におけるロット間変動の検定法として、FDA が推奨する ANCOVA 法と新たに開発したレンジに基づく方法の有用性を検討した。誤差が 0.5% 以下の分析法によって安定性データが得られる場合、レンジに基づく方法は ANCOVA 法に代わる方法として活用できる可能性を示した。

7) 原薬および製剤の不純物ガイドライン (Q3A および Q3B) における不純物の安全性確認に関する Q&A の作成に関して研究を行った。作成された不純物の安全性確認に関する Q&A は、不純物ガイドラインの解釈および運用方法を巡る混乱を解決するのに役立つものである。

8) 生物薬品の承認申請に際して添付資料、資料概要および承認申請書に記載すべき品質に係る事項に関して ICH ガイドラインなどをもとに検討した。これらの研究成果の一部は厚生労働省審査管理課の事務連絡「新医薬品の承認申請資料などに関する留意事項」に反映された。

9) 薬局方国際調和の現状を理化学試験法、微生物試験法、生物薬品試験法、医薬品添加物各条について検討した。薬局方国際調和の推進と国際調和された新しい品質評価基準の日本薬局方への反映における現状の問題点を明らかにした。

### 分担研究者

小嶋 茂雄	国立医薬品食品衛生研究所 薬品部長	内田 恵理子	生物薬品部診断用医薬品室長 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部遺伝子治療薬研究室長
吉岡 澄江	国立医薬品食品衛生研究所 薬品部第 2 室長	川崎 ナナ	国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部第 1 室長
山口 照英	国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部第 2 室長	豊島 聡	国立医薬品食品衛生研究所 医薬品医療機器審査センター長
川西 徹	国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部第 3 室長	武田 寧	日本公定書協会 専務理事
新見 伸吾	国立医薬品食品衛生研究所		

## A. 研究目的

新医薬品等の製造については、バイオテクノロジー一等の先端技術をより高度に応用した細胞・組織加工医薬品の開発や従来製品の製造方法の技術革新など、新たな展開がわが国においても急速に進んでいる。また、これらの新医薬品等の開発や技術革新の動向をうけて、品質、安全性を確保した製品を恒常的に提供する上で不可欠な品質・安全性確保基準及び製造管理技術・品質確保技術が検討されてきている。

今後我が国において、当該医薬品の品質及び安全性確保対策を推進する上で、これらの基準や技術を学問・技術の進歩に対応したより一層適切なものとしていくためには、これら製品の開発の進展が著しい外国での状況等を踏まえ、国際的な水準を勘案しながら、絶えず評価・検証を行う必要がある。

本研究は新医薬品等の品質及び安全性確保基準、製造技術及び品質確保技術について、外国での進捗状況を調査し、外国の技術水準に留意した科学的に妥当性のある品質・安全性確保基準や製造管理技術・品質確保技術の確立、検証及び評価に関する研究を行うものである。今年度は以下の項目について研究を行った。

- 1) 細胞・組織加工医薬品の品質・安全性確保のための試験法や基準に関する国際的動向について
- 2) 遺伝子治療用医薬品の品質・安全性確保に関する国際的動向—レトロウイルスベクターに混入する増殖性レトロウイルス検出法について
- 3) バイオテクノロジー応用医薬品の製造法の変更時の品質確保、同等性/同質性 (Comparability) 評価について
- 4) バイオテクノロジー応用医薬品の特性・品質解析、品質評価法の検討—同等性、同質性評価における LC/MS を用いた糖鎖マッピング法及び糖ペプチドマッピング法の有用性の評価について
- 5) 生物薬品の統一力価試験法の設定と標準物質の確立について
- 6) バイオテクノロジー応用医薬品に適用することのできるより信頼性の高い安定性試験法の確立について
- 7) 原薬及び製剤の国際調和不純物ガイドラインにおける不純物の安全性確認に関する解釈及び運用方法に関する検討—不純物の安全性確認に関する Q&A の作成について
- 8) 新しい品質規格を用いた製品の評価法—添付資料、承認申請書、添付資料概要に記載する事項について
- 9) 新しい品質評価基準の公定規格への反映—薬局方国際調和について

## B. 研究方法

### 1. 細胞・組織加工医薬品の品質・安全性確保に関する国際的動向

昨年制定された EU の「ヒト細胞治療医薬品の品質管理における留意事項」について研究を行い、我が国や米国との規制の違いや、共通する重要事項な

どを明らかにした。

### 2. 遺伝子治療用医薬品の品質・安全性確保に関する国際的動向—レトロウイルスベクターに混入する増殖性レトロウイルス検出法の検討— 増殖性ウイルス

増殖性レトロウイルス(RCR)としては、FDAにより RCR アッセイの感度の決定とアッセイのパリテーションに用いる標準ウイルスとして樹立された組換えレトロウイルス Hybrid Moloney/Amphotropic murine leukemia virus (Mo/AMLV; 感染力価:  $6.9 \pm 2.0 \times 10^7$  focus-forming units (ffu)/ml) を用いた。Mo/AMLV はモロニーマウス白血病ウイルス (MoMLV) のエンベロープ (env) 遺伝子のコード配列を 4070A 両種指向性マウス白血病ウイルス (4070A AMLV) の env 遺伝子領域に置換した組換えウイルスで、AMLV env のコード配列を組み込んだレトロウイルスパッケージング細胞から製造される典型的な組換えウイルスを代表するものである。

### ウイルスベクターの調製

レトロウイルスベクターは以下の方法で調製した。まず、改変型緑色蛍光タンパク質 (EGFP) 発現レトロウイルスベクタープラスミド pLEGFP-N1 (Clontech) を  $\Psi$  CRIP-P131 細胞 (MoMLV の gag/pol 遺伝子と 4070A の env 遺伝子を別々の発現ベクターに組み込んだ高タイトアのレトロウイルスベクター産生用パッケージング細胞株) に Effectene Transfection Reagent (Qiagen) を用いて遺伝子導入後、G418 薬剤選択により得られたコロニー 18 個からベクター産生細胞のスクリーニングを行った。スクリーニングには、NIH/3T3 細胞にポリブレン (final  $8 \mu\text{g/ml}$ ) 及びレトロウイルスベクター産生細胞クローンの培養上清を添加して 4 時間培養し、培地を通常の 10% ウシ胎児血清 (FCS) 含有ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM 培地) に交換してさらに 2、3 日間培養後、共焦点顕微鏡 (ZEISS LSM510、励起波長 488nm、蛍光波長 505-550nm) 及びフローサイトメーター (FACS Calibur, Beckton Dickinson、励起波長 488nm、FL1 検出) で EGFP 陽性細胞の割合を測定した。最も多くの GFP 陽性細胞を得た  $\Psi$  CRIP-LEGFP1 細胞を高力価レトロウイルスベクター産生細胞株として増幅、保存した。レトロウイルスベクターとしては  $\Psi$  CRIP-LEGFP1 細胞をサブコンフルエントまで培養後、培地交換を行った翌日の培養上清 (ベクター力価: 約  $1 \times 10^6$  colony forming units; CFU/ml) を用いた。

### リアルタイム定量 RT-PCR に用いるプライマー、プローブ

RCR の定量的検出には Mo/AMLV の env 領域の塩基配列について Primer Express Ver.1.0 (Applied Biosystems) で最適配列を検索して設計した以下のプライマーセットとプローブを用いた。Forward プライマー: 5'-GCG GTC GTG GGC ACT TAT A-3'; Reverse プライマー: 5'-TGT TGG GAA GTG GCC

GTA C-3'; TaqMan プローブ: 5' Fam-ATC ATT CCA CCG CTC CGG CCA-Tamra-3'.

#### ポリエチレンイミン結合磁気ビーズによるウイルス濃縮法

ポリエチレンイミン (PEI) 結合磁気ビーズは表面にカルボキシル基を持つ磁気ビーズ IMMUTEX-MAG (JSR Inc)を、水溶性カルボジイミド EDC (1-ethylene-3-(3-dimethylamino-propyl) carbodiimide HCl) 存在下、PEI(MW 70,000)とカップリングして作製した。

PEI-磁気ビーズを用いたウイルス濃縮は通常以下の方法で行った。種々の濃度の RCR を含むウイルス液に PEI-磁気ビーズ 100 $\mu$ l(10mg の磁気ビーズを含む)を添加混合後、室温で 10 分間静置した。この懸濁液を軽く遠心し、磁性スタンド (Magnetic Trapper または Dynal MOC-1) を用いて PEI-磁気ビーズ結合画分と磁気ビーズ処理上清画分とに分画した。PEI-磁気ビーズ結合画分は全量を、磁気ビーズ処理上清画分及び磁気ビーズ処理前のウイルス液の場合は 100 $\mu$ l をウイルスゲノム RNA の抽出に用いた。ウイルスゲノムの抽出はスマイテスト EX-R&D 核酸抽出キット(ゲノムサイエンス研究所)を用い、添付のプロトコールに従って実施し、50 $\mu$ l の DNase, RNase 不含蒸留水に溶解した。

#### リアルタイム定量 RT-PCR 及び PCR 反応条件

RCR の定量には、抽出したウイルスゲノムサンプル 10 $\mu$ l を Forward、Reverse プライマー各 1 $\mu$ M、TaqMan プローブ 0.2 $\mu$ M、TaqMan One-Step RT-PCR Master Mix Reagents Kit (Applied Biosystems) 25 $\mu$ l、40x MultiScribe and RNase Inhibitor Mix 1.25 $\mu$ l と混合して 50 $\mu$ l とし、ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems)を用いてリアルタイム定量 RT-PCR を行った。反応条件は 48 $^{\circ}$ C、30 分間の逆転写反応、95 $^{\circ}$ C、10 分間の熱処理後、95 $^{\circ}$ C、15 秒、60 $^{\circ}$ C、1 分の反応を 50 サイクル実施した。また、サンプルに含まれる AMLV env 領域をコードする DNA の検出には、ウイルスゲノムサンプル 10 $\mu$ l を Forward、Reverse プライマー各 0.5 $\mu$ M、TaqMan プローブ 0.1 $\mu$ M、TaqMan Universal PCR master mix (Applied Biosystems) 25 $\mu$ l と混合して 50 $\mu$ l とし、ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems)を用いてリアルタイム定量 PCR を行った。反応条件は 95 $^{\circ}$ C、10 分間の熱処理後、95 $^{\circ}$ C、15 秒、60 $^{\circ}$ C、1 分の反応を 50 サイクル実施した。RT-PCR または PCR 反応による目的バンドの増幅を電気泳動により確認する場合は、5%のアガロースゲルで分離後、Vistra Green (Amersham Pharmacia Biotech)でゲルを染色し、FluorImager 595 (Molecular Dynamics 社、488nm レーザースキャン、蛍光フィルター530DF30)により蛍光バンドを測定した。

#### RCR の感受性細胞による増幅

Mus dunni 細胞(2 x 10<sup>6</sup>個)を 60mm dish に播種して一晩培養後、培地を除去し、ポリブレン(16 $\mu$ g/ml)含有 McCoy's 5A-10% FCS 培地 1ml 及び RCR を希釈したウイルス液 1ml を加えて 37 $^{\circ}$ C で 4 時間培養した。同一濃度につき dish は 3-6 枚を使用した。感染後、培地 1ml で 3 回洗浄し、McCoy's 5A-10% FCS 培地 5ml を加えて培養後、経日的に培養上清を回収して RCR 濃縮・抽出用試料とした。ウイルスゲノムの抽出まで試料は-80 $^{\circ}$ C で保存した。

#### PG4(S+L)フォーカスアッセイ

RCR のウイルス学的検出法であるフォーカスアッセイは RCR 感受性細胞であるネコ fibroblast cell line の PG-4(S+L)細胞を指標細胞に用いた。PG-4(S+L)細胞(1 x 10<sup>6</sup>個)を 6 穴プレートの各穴に播種して一晩培養後、培地を除去し 20 $\mu$ g/ml DEAE デキストラン含有 McCoy's 5A-10% FCS 培地 1ml を添加して 37 $^{\circ}$ C で 30 分間培養した。RCR を希釈したウイルス液 1ml を加えてさらに 37 $^{\circ}$ C で 2 時間培養後、培地を除去し、通常培地 2ml を加えて培養した。6-10 日後、フォーカス形成の有無を顕微鏡下で観察した。

#### 3. バイオテクノロジー応用医薬品の製造法の変更時の品質確保、同等性/同質性(Comparability)評価

製造方法の変更が医薬品の品質に及ぼす影響の評価、とりわけ製造工程の変更内容からどのような評価法が適切かについて、関連する公表論文、米国 FDA の関連文書、EU CPMP の関連文書、米国製薬工業協会 (PhRMA) の関連文書、インターネットによる検索によって得られた米国、および欧州の関連情報、また遺伝子組換え医薬品、細胞培養医薬品、遺伝子治療用医薬品、細胞治療用医薬品の品質、有効性、安全性確保を図る過程あるいは関連する評価技術の開発研究を行う過程で蓄積されてきた経験や知見、ICH 文書の関連部分、さらには欧米の専門家との情報交換、討議等を参考に検討を行った。

#### 4. バイオテクノロジー応用医薬品の同等性、同質性評価法としての LC/MS を用いた糖鎖マッピング法及び糖ペプチドマッピング法の有用性評価 エリスロポエチン (EPO)

EPO は CHO 細胞、及び BHK 細胞で産生し、精製したものを用いた。便宜上、EPO-A、-B、及び-C とした。

#### 糖鎖の調製

EPO (400 $\mu$ g) を 500 $\mu$ l のリン酸緩衝液 (pH 6.4) に溶解し、2 単位の N グリコシダーゼ F と 37 $^{\circ}$ C で 20 時間反応させて糖鎖を切り出した。70% 冷エタノールを加えてタンパク質を除去し、糖鎖を回収後、NaBH<sub>4</sub> で還元して糖アルコールとした。

#### エキソグリコシダーゼ消化

糖アルコールを酢酸アンモニウム (pH 4.5) に溶

解し、シアリダーゼ、またはシアリダーゼ、及びβ-ガラクトシダーゼと 37 °C で 20 時間反応させた。

6-36 % に上昇させた

#### 糖ペプチドの調製

EPO (1 mg) を 100 mM 酢酸アンモニウム (pH 8.0) 1 ml に溶かし、エンドプロテアーゼ Glu-C (0.25 mg) を 62 μl の酢酸アンモニウム (pH 8.0) に溶解させたものを加えて、37°C で 20 時間消化した。

#### 糖鎖マッピング

##### ① HPLC

HPLC 装置 : Finnigan spectrasystem (p4000 pump, UV2000, finnigan 社)

分離カラム : Hypercarb (2.1 x 100 mm, Hypersil 社)

流速 : 0.2 ml/min

検出波長 : 206 nm

移動相 A : 5 mM 酢酸アンモニウム

移動相 B : 5 mM 酢酸アンモニウムを含む 80 % アセトニトリル

グラジエント : 90 分間で移動相 B を 30-58 % に上昇させた

##### ② 質量分析法

エレクトロスプレーイオン化トリプルステージ四重極型 MS/MS システム : TSQ-7000 (Finnigan 社)

測定モード : ネガティブイオンモード (シアロ糖鎖)

ポジティブイオンモード (エキソグリコシダーゼ消化糖鎖)

シースガス : 70 psi

オグジュラリーガス : 10 unit

キャピラリー温度 : 225°C

マルチプライヤー : 1000-1200 V

ESI 電圧 : 4500 V

スキャン範囲 : 1000-1600 (シアロ糖鎖)  
800-2000 (エキソグリコシダーゼ消化糖鎖)

スキャン回数 : 2 秒 (シアロ糖鎖)

3 秒 (エキソグリコシダーゼ消化糖鎖)

#### 糖ペプチドマッピング

##### ① HPLC

HPLC 装置 : Finnigan spectrasystem (p4000 pump, UV2000, Finnigan 社)

分離カラム : Vydac C18 (2.1 x 250 mm, Vydac 社)

流速 : 0.2 ml/min

検出波長 : 206 nm

移動相 A : 1 mM 酢酸アンモニウム

移動相 B : 1 mM 酢酸アンモニウムを含む 80 % アセトニトリル

グラジエント : 移動相 B を 60 分間で 1-6 % に上昇させた後、60-140 分で

##### ② 質量分析法

エレクトロスプレーイオン化トリプルステージ四重極型 MS/MS システム : TSQ-7000 (Finnigan 社)

測定モード : ネガティブイオンモード

シースガス : 70 psi

オグジュラリーガス : 10 unit

キャピラリー温度 : 225 °C

マルチプライヤー : 1200 V

ESI 電圧 : 4500V

スキャン範囲 : 1000-2400

スキャン回数 : 3 秒

#### 5. 生物薬品の統一力価試験法設定と標準物質の確立に関する検討

##### 緩衝液(I=3.0)

3.03g のトリス (ヒドキシメチル) アミノメタンと 1.7g のイミダゾールを 50ml の 1M 塩酸に溶かし、蒸留水で全量を 100ml にした。この液に 11.7g の塩化ナトリウムを加えて溶かし、溶液 A とした。4.04g のトリス (ヒドキシメチル) アミノメタン、2.27g のイミダゾール、0.6g のアジ化ナトリウム、1.95g の塩化ナトリウムを蒸留水に溶かし、全量を 100ml とした。この液に 11.7g の塩化ナトリウムを加えて溶かし、溶液 B とした。100ml の溶液 B に対して溶液 A を適宜混合し pH8.4 に調整した。この混合液を緩衝液 (I=3.0) とした。

##### ヒトトロンボモジュリン(h-TM)サンプル

組換えヒト型トロンボモジュリン (rh-TM) 標準物質(TS6)は適量の rh-TM 溶液をアンプルに加え、凍結乾燥することにより調製した。rh-TM 標準物質を含む 1 アンプルに 1.0ml の蒸留水を加えて溶かし、そのうちの 0.25ml を 0.05%(v/v) ツイーン 20 を含む 10%(v/v) の緩衝液 (I=3.0) 4.75ml と混合した。ヒト尿由来トロンボモジュリン (uh-TM) 標準物質(TM003)は適量の uh-TM 溶液をバイアルに加え、凍結乾燥することにより調製した。uh-TM 標準物質を含む 1 バイアルに 0.05%(v/v) ツイーン 20 を含む 10%(v/v) の緩衝液 (I=3.0) 2.625ml を加えて溶かし、そのうちの 1ml を 0.05%(v/v) ツイーン 20 を含む 10%(v/v) の緩衝液 (I=3.0) 3ml と混合した。これら h-TM 溶液は 0.05%(v/v) ツイーン 20 を含む 10%(v/v) の緩衝液 (I=3.0) 3ml で 2 倍、2.5 倍、3.33 倍、5 倍、10 倍に希釈し、そのうちの溶液 1ml を 0.05%(v/v) ツイーン 20 を含む 10%(v/v) の緩衝液 (I=3.0) 3ml と混合した。

##### アンチトロンピンⅢ (ATⅢ) 1次保存溶液 (25 単位/ml)

ヒト ATⅢ を含むバイアルに 20ml の蒸留水を加え、バイアルをゆるやかに振盪させながら溶かした。得られたヒト ATⅢ 1次保存溶液 (25 単位/ml) は液体窒素で凍結し-40°C で保存した。

### ATⅢ 2次保存溶液 (2 単位/ml)

ATⅢ 1次保存溶液 (25 単位/ml) を 37℃ の水浴で溶かし、0.154M 塩化ナトリウム、3.78mM クエン酸ナトリウム、54.9mM マンニトールを含む緩衝液で 2 単位/ml に希釈した。得られた ATⅢ 2次保存溶液 (2 単位/ml) は液体窒素で凍結し -40℃ で保存した。

### ヘパリン及びヒト ATⅢ (HP-ATⅢ) 溶液

HP-ATⅢ 溶液は 1 反応当たり ATⅢ 2次保存溶液 (2 単位/ml)、0.0425ml の 10%(v/v) の緩衝液 (I=3.0)、10%(v/v) の緩衝液 (I=3.0) で希釈して調製したヘパリン (30 単位/ml) 0.05ml を混ぜることにより調製した。

### プロタック溶液 (0.75 単位/ml)

凍結乾燥したプロタックを含むバイアルに 0.18%(w/v) アジ化ナトリウム 4ml を加えて溶かした。

### h-トロンピン溶液 (40 単位/ml)

h-トロンピンは 0.15M 塩化ナトリウム、0.5%(w/v) ポリエチレングリコール 6000 を含むバッファーで溶解し 40 単位/ml に調製した。得られた h-トロンピン溶液 (40 単位/ml) は液体窒素で凍結し -80℃ で保存した。

### S-2366 保存溶液

凍結乾燥した S-2366 を含むバイアルに蒸留水 2.9ml を加えて溶かした。

### TM 活性測定用の S-2366 溶液

S-2366 保存溶液 3ml は 60mM 塩化カルシウムを含む 10%(v/v) の緩衝液 (I=3.0) 2.5ml、0.5%(v/v) ツイーン 20 を含む 10%(v/v) の緩衝液 (I=3.0) 1.5ml、緩衝液 (I=3.0) 1.1ml、蒸留水 6.9ml で混和した。

### プロテイン C 活性測定用 S-2366 溶液

S-2366 保存溶液 7.5ml は 60mM 塩化カルシウムを含む 10%(v/v) の緩衝液 (I=3.0) 2.5ml、0.5%(v/v) ツイーン 20 を含む 10%(v/v) の緩衝液 (I=3.0) 1.5ml、緩衝液 (I=3.0) 1.1ml、蒸留水 2.4ml で混和した。

### プロテイン C 溶液 (12 単位/ml)

h-プロテイン C 溶液 (0.5~2.0mg/ml) の一部を 0.5%(v/v) ツイーン 20 を含む 10%(v/v) の緩衝液 (I=3.0) で 15 μg/ml に希釈した。プロテイン C 溶液の活性は以下のように測定し定義した。結果に基づきプロテイン C 溶液 (0.5~2.0mg/ml) は 0.5%(v/v) ツイーン 20 を含む 10%(v/v) の緩衝液 (I=3.0) で 12 単位/ml に希釈した。プロテイン C 溶液 (12 単位/ml) は液体窒素で凍結し、-80℃ で保存した。

### プロテイン C 活性の測定と活性の定義

プロテイン C 溶液 (0.5~2.0mg/ml) は 0.5%(v/v) ツイーン 20 を含む 10%(v/v) の緩衝液 (I=3.0) で 15

μg/ml に希釈した。なお以下の反応は 37℃ で行った。プロテイン C 溶液 (15 μg/ml) 100 μl は 10%(v/v) の緩衝液 (I=3.0) 500 μl、Protac<sup>3</sup> 溶液 (0.75 単位/ml) 400 μl と混和した。4 時間後、反応混液を氷水中に置き反応を停止した。反応混液は 0.05%(v/v) ツイーン 20 を含む 10%(v/v) の緩衝液 (I=3.0) で 2 倍に希釈し、この希釈反応混液のうち 25 μl を予め 37℃ に温めた S-2366 溶液 475 μl と混和した。30 分後 50%(v/v) 酢酸 1.5ml を加えて反応を止めた。ブランク溶液は上記希釈反応混液 25 μl に 50%(v/v) 酢酸 1.5ml と混合した S-2366 溶液 475 μl を加えて調製した。これらのサンプルにおけるパラニトロアニリンの吸光度は分光光度計を用い 405nm の波長で測定した。この測定において 1 単位は反応 1 分間当たり 1 μmol のパラニトロアニリンを生成するプロテイン C の活性と定義した。この定義に基づき活性は次の式により計算した。

活性 (単位/ml) =

$$\frac{(A1 - A2) \times K1 \times V4}{M \times T} \times \frac{V2}{V3} \times \frac{1}{V1} \times K2$$

A1: サンプルにおける吸光度

A2: ブランクにおける吸光度

K1: 2 [最初の反応 (プロテイン C 活性化) 後の反応混液の希釈係数]

M:  $9.6 \times 10^{-3}$  (  $E_{1cm}^{\mu mol}$  ) (パラニトロアニリンのマイクログラム吸光係数)

T: 30 分 [基質とのインキュベーション時間 (2 番目の反応) ]

V1: 0.1ml [反応混液 (最初の反応) の最初の容量]

V2: 1ml [反応混液 (最初の反応) の最終容量]

V3: 0.025ml [反応混液 (2 番目の反応) の最初の容量]

V4:  $2 \times 10^{-3}$  [反応混液 (2 番目の反応) 最終容量]

K2: プロテイン C 溶液 (15 μg/ml) 調製時の希釈係数

### TM 活性の測定と活性の定義

共通力価測定法の基本的な操作は Fig. 1 に示している。なお、以下に示す全ての反応は 37℃ で行った。h-TM サンプル 25 μl のトロンピン、20mM 塩化カルシウムを含む 10%(v/v) 緩衝液 (I=3.0) 75 μl と混和し、10 分インキュベーションした。次にプロテイン C 溶液 (12 単位/ml) 25 μl を反応液に加えた。10 分後 HP-ATⅢ 溶液 100 μl を添加することにより反応を停止した。形成された活性化プロテイン C の量は S-2366 溶液 250 μl を加えることにより測定した。種々の時間インキュベーション後、50%(v/v) 酢酸 1.5ml を加えて反応を停止した。パラニトロアニリンの吸光度は分光光度計を用い 405nm の波長で測定した。ブランク溶液は h-TM 溶液の代わりに 0.05%(v/v) ツイーン 20 を含む 10%(v/v) の緩衝液 (I=3.0) を用いた以外、上記のように調製した。本測定で、反応 1 分当たり 0.1 μmol のパラニトロアニリンを生成する TM の活性を 1JRS 単位と定義し

た。この定義に基づき活性は以下の式により計算した。なお、アンプル当たりの h-TM 活性は個々の測定において希釈係数を掛けて計算した。

活性 (JRS 単位/ml) =

$$\frac{(A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) \times V1 \times \text{希釈係数}}{M \times V2 \times T \times K}$$

M:  $9.6 \times 10^{-3}$  (  $E_{1\text{cm}}^{\text{mol}}$  ) (パラニトロアニリンのマイクログラム吸光係数)

V1:  $2.0 \times 10^{-3}$  ml (反応混液の最終容量)

V2: 0.025 ml (TM サンプルの容量)

T: 基質とのインキュベーション時間 (分)

k :  $0.1 \mu\text{mol}/\text{分}/\text{JRS 単位}$  (力価の定義に基づく係数)

#### 共通力価測定法による h-TM 国内標準物質の活性測定

rh-TM (TJRS1) 3 アンプルを 1 回の測定に用い、測定は異なった日に 3 回繰り返した。

#### 6. 安定性試験における品質確保基準に関する研究安定性試験データの発生

医薬品の経時的な分解がゼロ次速度式によって表されると仮定し、3 ロットの安定性試験データをモンテカルロ法によって 500 セット発生させた。分解曲線の切片は 100% と仮定した。また、分解曲線の傾きは、3 ロット中 2 ロットでは 0.1%/month、残りの 1 ロットでは 0.12%/month あるいは 0.13%/month と仮定した。すなわち、1 ロットが他のロットより 20% あるいは 30% 大きい傾きを持つと仮定した。正規分布 (平均 0 および 0.02~2.0% の標準偏差) から選んだ乱数を分解曲線の理論値に加えて、0、3、6、9、12 および 18 ヶ月時点における測定データを得た。測定の繰り返し回数は 2 回とした。理論値に加えた定量誤差の分布は、Fig.2 に示すように、正規分布を示した。

#### ANCOVA 法によるロット間変動の検定

FDA SAS Formulation Stability Program を基に開発された PASG Excel routine (<http://pasg.org.uk/excel.htm>) を用いて 500 セットの安定性データのロット間変動を評価した。含量規格値は 95-105% とした。ロット間の安定性の差を見逃す確率 ( $\beta$  誤差) として、各ロットの回帰曲線が共通の傾きおよび切片をもつと判断された確率を求めた。

#### レンジに基づく方法によるロット間変動の検定

上記の 500 セットの安定性データに基づいて、各ロットの有効期間を PASG Excel routine を用いて推定した。個々のロットについて得られた有効期間の推定値のレンジ (3 つの推定値の中での最大値と最小値の差) を計算し、レンジが最大値の 15% より小さい場合には、個々のロットからの有効期間の推定値は同等であると判断した。 $\beta$  誤差として、個々

のロットからの有効期間が同等であると誤って判断された確率を求めた。

#### 7. 不純物の安全性確認に関する Q&A 作成

日本製薬工業協会 (製薬協) において、品質および安全性の専門家からなるプロジェクトチームを編成した。このプロジェクトチームは、製薬協各社に対するアンケート調査などを通じて問題点を把握し、その解決策の検討結果を基に、2000 年 5 月に不純物の安全性確認に関する Q&A 原案 (Ver.1) を作成した。

この Q&A を官民共通のベースとなるものとした。この製薬協からの申し入れに応じて、この Q&A 原案を国立医薬品食品衛生研究所 (国立衛研) の品質および安全性の専門家ならびに国立衛研医薬品医療機器審査センターの品質および安全性の担当者で検討が行われ、出された意見を基に修正案 (Ver.2) が作成されて、2000 年 12 月に製薬協側に提示された。その後、Table 1 に示したように、製薬協側と国立衛研側の間で数次にわたって修正案の交換が行われた結果、2001 年 7 月の Q&A 修正案 (Ver.6) で最終的に解決すべき論点が明確にされたことから、2001 年 9 月に国立衛研と製薬協の関係者が集まって話し合いが行われ、その結果に基づいて最終案 (Ver.7) が作成された。

#### 8. 新しい品質規格を用いた製品の評価法

最近のバイオテクノロジー応用医薬品に関して承認申請資料の記載を検討した。また生物薬品に関わる各種ガイドライン (ICH ガイドライン Q5A、Q5B、Q5C、Q5D、Q6B 等) を検討し、添付資料、申請書及び添付資料概要に記載すべき事項に関して考察した。

#### 9. 新しい品質評価基準の公定規格への反映—薬局方国際調和—

薬局方国際調和の現状を理化学試験法、微生物試験法、生物薬品試験法、医薬品添加物各条について検討した。

(倫理面への配慮)

本研究では人や動物を用いた研究は実施していないため、倫理面の問題は無い。

#### C. 研究結果

##### 1. 細胞・組織加工医薬品の品質・安全性確保に関する国際的動向

近年、バイオテクノロジー応用技術の進歩や幹細胞研究・再生医学の技術的進歩により、ヒトまたは動物の細胞や組織を培養、加工し、様々な疾患の治療に直接用いる医療 (細胞治療) の開発が急速に進展している。このような細胞や組織から構成される医薬品や医療用具 (細胞・組織加工医薬品等と呼ぶ) を医療に用いることができれば、ガン、筋ジストロフィー、再生不良性貧血、心筋梗塞などの致死的な疾患、あるいは糖尿病、リウマチ、骨粗しょう症、

重篤な肝疾患、神経疾患、熱傷、創傷等に対してきわめて有効な治療法になる可能性が高い。我が国においても、様々な形での細胞・組織加工医薬品等の開発が進められているところであるが、本格的な実用化に至るためには検討すべき課題は多い。特に、感染性物質の混入やガン等の望ましくない細胞の出現を的確に検出するためにどのような試験を行うべきか、またその規制はどうあるべきか検討すべき課題は多い。このような規制は、用いる細胞・組織の危険度に応じて行うことが科学的に妥当な場合も多いと考えられる。すなわち、このような未知・未経験の多い領域の規制については、感染症の伝播などの安全性をいかに担保するかが極めて重要であるが、一方、過度な規制を行わないことにより革新的な医療開発を促進することも重要である。

本研究では、今年度は細胞や組織を加工した細胞・組織加工医薬品等の品質、安全性等を確保するために、どのような規制が行われようとしているのか、またその科学的根拠の国際的動向について、主としてEUの最新情報を基に、日本やFDAの現状等と比較しながら研究を行った。

EUの最新情報として欧州医薬品審査庁ヒト用医薬品評価部門(EMEA)の「ヒト細胞治療医薬品の品質管理における留意事項」や関係専門家からの情報について検討した結果、以下のような特徴が明らかになった。

### 1.1 一般事項(規制対象範囲を含む)

EUのガイドラインはヒト体細胞を用いる細胞治療用医薬品を対象としており、昨年制定された我が国の「ヒト由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針」と共通している。しかし、EUにおいては培養皮膚等の細胞治療用製品は医療器具に属し、規制の主体がEMEAではないため我が国のガイドラインの対象となっている範囲とは異なっている。さらに、EMEAガイドラインでは、細胞治療用医薬品の対象となるのは生きている体細胞を投与する場合と規定されており、この点も我が国の規制とは異なっている。一方、我が国では、異種由来細胞を用いた細胞治療についても今後検討することになっており、この点はEUと大きく異なる点である。

次に、日本と欧米の細胞治療の比較表(Table 2)に示したように、細胞治療用医薬品の規制において、最も重視している点が明らかにされているが、各国とも共通して感染性因子の伝播の防止を取り上げている。これは、細胞治療用医薬品においては、精製や感染因子の不活化といった操作を行うことが殆ど不可能であることから、その安全性に関して特に注意を払う必要があるためである。言い換えれば、このような革新的な治療推進にあたっては、その安全性確保が細胞治療に対する国民の信頼を得るために必須の事項であるという点である。

さらに、各国とも細胞治療用医薬品の品質の確保がうたわれている。この品質の確保に大きなインパクトを持つのが、製品の品質基準であり、また製法

の一定性を担保する方策である。

### 1.2 EUにおける細胞治療用医薬品の開発と評価に関する留意事項

EUのガイドラインでは細胞治療用医薬品としてヒト由来細胞のみを対象としており、さらに自己由来細胞を対象とするか、同種の非自己細胞を対象とするかによって2つに分類して原材料としての細胞の適正を評価するとしている。

非自己からのドナーについては血液製剤の供血者及び移植ドナーと同様の厳格な基準で評価を行う必要があるとしている。さらにこの評価には、血液型や主要組織適応抗原、場合によってはマイナー抗原などの多型性についても考慮する必要性が述べられている。このような事項に関しては、我が国における規制とも共通する点である。

#### 1.2.1 非自己からのドナーの適合性

ドナー適性としては、主として感染性因子の伝播をいかに防止するかの観点からガイダンスが行われている。ドナースクリーニングでは、ドナーの年齢、性別、病歴、最近の健康状態に加えて、採取した細胞に危険性があると考えられるような遺伝的疾患に関するすべての家族歴も参照されるべきとしている。また、HIVや肝炎ウイルスあるいはマイコバクテリアやレンチウイルス、海綿状脳症の原因因子などの伝達性因子の存在や存在の可能性についての排除基準を明確にしておく必要があるとされている。

さらに、基本的に感染因子に暴露された可能性のあるドナーあるいは感染の危険性にさらされたドナーから細胞は採取すべきではないとし、どうしても採取しなければならない場合には、感染因子の破壊が行われなければならないとしている。

適切なドナーの選択基準やハイリスクあるいは不適切なドナーを排除するための手順を設定するとともに基準を文書化しその妥当性を明らかにしておくべきであるとしている。

特に、ウイルス感染防止の観点から、どのようなウイルスに着目した検査をすべきかについて、具体的なウイルスを例示している。このようなドナースクリーニングに関する事項については、Table 3に示すように我が国のガイドラインの方がより具体的にスクリーニングの内容や、問診の注意事項について触れている。

一方、米国ではドナースクリーニングに関してより詳細なガイダンスが行われている。これは、米国では細胞・組織加工医薬品の規制範囲が非常に広いことや、経験が豊富な血液製剤におけるドナースクリーニング基準を準用しているためと考えられる。またEUもドナー適合性に血液製剤における基準を参照することを求めている。

#### 1.2.2 自己細胞を用いた治療

自己由来であることを記載した文書やトラッキング手続きにしたがって確実にドナーの確認を行うことを求めている。また、その患者にのみ用いることができることを示すような、例えば「自己治療用

限定」とのラベルを細胞製品に貼付しておくべきとされている。一方、細胞は自己由来であることから免疫学的には全く同等の性質を持ち、その使用にあたっては、望ましくない免疫反応の惹起や感染性因子等に関する基本的な安全性の試験については省略することができるかとされている。

しかし、外来性の感染因子に関して、製品の製造に用いる機器からの相互汚染の問題等に注意を払う必要があり、自己由来の細胞治療用医薬品でも、細胞の微生物やウイルス安全性及び患者の血清学的性質等に関しては同種由来の場合と同じ品質基準が適用されるべきとしている。

FDA では、自己の細胞を用いる場合は、外来性因子の試験及びラベリングの追加等を行うように求めている。日本でも、自己由来の細胞・組織を用いる場合は必ずしもドナースクリーニングを必要としないとされている。

以下に EU における製造工程や細胞培養工程、製剤化、細胞取扱い操作と装置の評価、品質管理プログラム等に関する規制についての調査結果を示す。

### 1.3 製造工程に用いる他の原材料や試薬の供給とその性質

#### 1.3.1 一般的な考慮事項

細胞治療用医薬品の遺伝的あるいは表現形質を改変するために、酵素、抗体、サイトカイン、血清、抗生物質や他の化学物質あるいは培養基材などの様々な材料が必要とされる。しかし、そのような材料は時として最終製品の品質、安全性、薬効に望ましくない影響を与える可能性もある。したがって、製造に用いる各々の試薬や材料等は、十分に特性解析がなされ、その使用の適切性を評価しておく必要がある。細胞を採取し、選別し、加工するための材料や方法は、詳細に記載される必要がある。添加剤 (ancillary product) の無菌性、感染物質の存在の否定あるいはエンドトキシンが許容範囲以下であることが保証されなければならない。細胞の増殖や接着を支持する新規材料の機能や免疫反応を利用した細胞分離装置等が使用目的にかなっていることをバリデーションし、有用性を明らかにしておく必要がある。

培養液や増殖因子、サイトカインや抗体等の添加剤の品質について確認試験、純度、無菌性、生物活性あるいは感染因子を含まないことを明らかにしておくこと。過敏症を引き起こす可能性のある試薬の使用はさける事が望ましい。

細胞治療用医薬品の製造工程には高度な精製過程あるいはウイルス除去工程や不活化工程が含まれない。したがって、全てのヒトあるいは動物由来原材料についての受入れ基準は極めて厳格なものである必要がある。

品質の観点から、組換え DNA 技術を用いた医薬品の製造と品質管理に関するガイドラインやモノクローナル抗体の製造と品質管理に関するガイドラインを必要に応じて参照すべきである。

#### 1.3.2 ヒト由来材料や試薬に関して特に考慮すべき

#### 事項 (アルブミン、免疫グロブリン等)

細胞の至適増殖に必要なヒト由来試薬については、CPMP の「血漿分画製剤に関するガイドライン」の対象となる血漿分画製剤と同一の手法によりその適切性が評価されたものでなければならぬとされている。海綿状脳症の伝播を防ぐために関連する EC の規制やガイドラインに従った評価を行う必要がある。細胞治療に用いる細胞と同じ自己血清を用いる場合には、同種由来の血清を用いるのとは異なった判断基準を適用することができる。

#### 1.3.3 製造工程で用いる動物由来原材料や試薬に関して特に考慮すべき事項

動物由来の試薬は、種々の感染因子を含む可能性があり、レシピエントに予期せぬ免疫学的反応を引き起こす可能性もある。動物由来試薬に代えて組成の明らかにされた非動物由来試薬を用いることが望ましい。もう一つの選択肢としては、ドナーと同じ自己血清を用いることであるが、不可能であれば同種のヒト血清を用いることがあげられる。動物由来材料の使用にあたっては、ヒト及び家畜医薬品を介した海綿状脳症の伝播を避けるための CPMP と CVMP ガイドライン (EMEA/410/01, rev.1) を遵守する必要があるとされている。また放射線照射を行った血清や合成培地の使用を考慮すべきである。

#### 1.4 細胞培養工程

細胞培養を行う際には、分離した細胞の最適な増殖が維持され、望ましい加工操作ができるように注意を払う必要がある。各製造工程は、目的とする細胞状態や機能が保持されるよう適切にデザインされたものであるべきである。製造工程での各操作を、工程管理基準に従って正確にモニターし、その詳細を記録しておくこと。微生物汚染の防止は、工程管理と品質評価の最も重要な柱である。全ての細胞治療用医薬品に付随する危険性として伝染性疾患の伝播が挙げられるが、その危険性の程度やその危険性を低減させるための最も有効な方策は、その原材料である細胞や組織の性質によって異なってくる。細胞治療用医薬品のリスク評価は、このような原材料の特性を考慮するとともにその臨床上的使用目的、及び製造者や試薬からの汚染物質の混入の可能性を考慮する必要がある。

細胞培養工程の幾つかのステージを選び、細菌、イースト、真菌、あるいはマイコプラズマなどの感染物質の存在をモニターし、汚染のないことを確認する必要がある。培養工程での微生物汚染否定試験と細胞の増殖特性についての試験を行う必要がある。予め具体的なウイルス試験要領を作成しておく必要がある。細胞培養工程の恒常性や再現性を記録しておく必要がある。培養工程での細胞の生存率、細胞の密度やコンフルエントの状態、純度、培養期間の長さや最高到達 PDL 数等の重要なパラメーターの限度値を明らかにしておく必要がある。

細胞製品中に感染因子が存在すれば水平感染の大きな危険性が生じる。感染症の水平感染の危険性レ

ベルは以下のような点を考慮して判断すべきである。

- ・ 製品を自己治療に用いるのか同種を対象としているのか
- ・ 製造現場において複数のドナー由来の細胞を加工したり取り扱ったりすることによる相互汚染の危険性
- ・ 細胞をどのように操作するか、またどのような条件で操作するか

自己や同種の細胞治療用医薬品の製造では、細胞加工に用いる機器や液体窒素タンクなどの保存容器などから感染性因子が混入する可能性があり、同一製造現場で多様な細胞製品が採取され、加工され、保存されている場合は感染の危険性を増加させる可能性が高い。したがって、製造施設については十分な管理体制をとる必要がある。

細胞の採取、保存、移送、加工に際しては、ドナースクリーニング、ドナーや製品の評価を行うとともに、細胞を一定期間管理保管することを考慮すべきである。細胞の不適切な取り扱いや加工は、細胞製品の生存性に悪影響を与えたり有害事象を引き起こし、ひいては治療の失敗につながる。細胞製品の相互汚染は、感染症の危険性も増加させることになる。最終製品の出荷の前に、全ての検査と試験が完了していることが望ましい。一方、ある種の細胞治療用医薬品では、そのような品質管理試験を出荷の前に行うことが不可能であったり現実的でなかったりする。したがって、出荷のために梱包された製品の品質を保証するための一連の試験として、保管されている製品の品質を保証するような方策を定めておく必要があるかもしれない。

#### 1.4.1 細胞の均一性や不均一なポピュレーションからなる細胞集団の一定性確認

同種細胞を用いる場合には目的とする細胞の表現型や遺伝的性質について、その機能や活性ばかりでなく最終細胞製品の特性として適切な細胞表面マーカーや生化学マーカーについて解析を行う必要がある。

特定の培養条件で形質転換した細胞は、正常細胞に比べて増殖能が優れていることがあることから、増殖因子への応答性に着目して、細胞の形質転換が起こっている可能性について考慮を払うべきである。

遺伝子改変された細胞集団については、新たに獲得した性質が再現性よく、また適切に発現されているかことを試験する必要がある。適応可能でかつ実施可能であれば、その発現を定量し、かつその発現量が制御可能であることを明らかにするべきである。この点に関しては、遺伝子治療用ベクターの品質管理、特性解析や前臨床試験の詳細について具体的に記載されている遺伝子治療医薬品の品質、前臨床及び臨床に関する CPMP のガイドラインを参照すること (CPMP/BWP/3088/99) とされている。

#### 1.4.2 細胞培養期間

初代細胞培養、株化された細胞系、さらにはクロ

ーナルな細胞に応じて、遺伝的性質や表現形質を明らかにし、それぞれの培養期間を通じての安定性に関して明らかにしておく必要がある。培養の継続期間は、治療目的に応じた細胞機能が保持されるように設定されている必要がある。

#### 1.4.3 細胞の保存と細胞バンクシステムの構築

適切な細胞保存管理システムを構築しておくべきである。細胞治療用医薬品の製造において最終製品中の細胞特性に影響を及ぼすことのないような細胞の適切な凍結保存、解凍法及び供給が可能な一連の工程を確立する必要がある。

セルバンク作製が可能であれば、マスターセルバンク及びワーキングセルバンクを樹立するべきである。樹立した細胞バンクに関して、生物学的性質やその機能に関して詳細に解析するとともに、内因性及び外来性の感染因子 (細菌、真菌、イースト、ウイルスやマイコプラズマ) に汚染されていないことを明確にすること。細胞は、細胞の生存性、密度、純度、無菌性や機能を保持できるような十分に管理された最適条件で保存されるべきである。細胞の同定は、遺伝的性質や表現形質による確認や、細胞集団のなかで目的とするこれらの指標をもつ細胞の比率を解析することによって確認するべきである。

#### 1.5 製剤化

治療用細胞製剤の投与では、幾つかの経路、すなわち血管内投与や特定部位への注入、あるいは外科的な移植が考えられる。レシピエントの免疫監視機構を逃れるために生体適合ポリマーに封入された細胞を用いることも可能である。用いられるポリマーは、その物理化学的性質に関して十分に特性解析され、科学的妥当性のある規格によって品質管理されている必要がある。臨床目的に応じたポリマーの適合性については、生物学的同等性や耐久性に関して十分な評価が行われなければならない。構造や生物活性の維持あるいは免疫隔離の目的のために目的細胞に使用されるファイバーやビーズなどの他の補助的な構成成分は、最終製品の一部として捉え、それぞれの目的に応じて評価するべきである。

細胞製品は、機械的構造物あるいは合成化学物質とともに、あるいは他の医薬品や非細胞生物製品と組み合わせて使用される場合がある。このような他の物質と組み合わせて使用される細胞治療用医薬品では、機能や同等性あるいは持続性に関して特別な配慮が必要である。そのような細胞とともに組み合わせて使用される材料については、十分な時間その機能が維持され、回りの組織に副作用を及ぼさずに目的とする機能が保持されることが絶対条件である。

#### 1.6 細胞取り扱い操作と装置の評価

細胞を操作する全てのステップは、使用する装置を含め次のような項目について十分にバリデーションしておく必要がある。

- ・ 工程への微生物汚染防止管理
- ・ 細胞の生存率

- ・ 細胞増殖や適応可能であれば細胞分化能
- ・ 細胞の同定
- ・ 細胞の活性や機能
- ・ 必要ならば遺伝子導入効率
- ・ 輸送に用いる容器やその方法

以上のバリデーションは GMP にのっとり定期的に行う必要がある。バリデーションに際しては、細胞操作中の相互汚染や操作終了後に残存する材料からの相互汚染防止のための洗浄操作に関しても充分考慮することが必要である。

### 1.7 品質管理プログラム

品質管理に関するこの項は、EC 内で出された GMP 関連ガイドラインや ICH ガイドラインを参考にしながら読まれるべきものであるとされている。細胞の採取、保存、操作や品質管理さらには最終容器への梱包等を行う施設においては、必ず品質管理プログラムを策定しそれに従った操作を行うこと。治療用細胞の各取扱い工程について品質管理プログラムを作成し、文書化するとともに、取扱説明書を作成し、効果的な品質管理を行うべきである。品質管理プログラムでは、統括責任者を指名しておくこと。責任者は、委員会令 75/319/EEC の条項 21 (修正) に記載にしたがって行動することとされている。

以下のような観点について品質管理プログラムを作成すること。

- ・ (細胞治療用医薬品の) 製造目的にかなう適切な施設・設備
- ・ 使用目的に応じて採用された機器の保証書とバリデーション
- ・ 標準操作マニュアルの作成
- ・ 細胞提供者を追跡するための十分な記録の作成：例えば採取日、採用した品質管理試験とその結果等
- ・ 製造工程に受け入れる原材料細胞の試験の設定
- ・ 原料細胞や最終細胞製品のラベル表示、保存、移送における充分な管理
- ・ 管理検査とその報告書の作成

### 1.8 パッチ確認試験、最終製品、ロット出荷試験

細胞提供者のトレーサビリティを完璧に保証するための十分な製造パッチ確認システムを確立する必要がある。最終容器に適切なラベル表示を行うことにより調製した細胞パッチを確実に確認できるようにすべきである。工程の各ステージの記録を正確に残しておくべきである。自己由来細胞を用いる治療においては、その特性から規格や必要項目の設定をより柔軟に行うことができるよう全製品を一つのバッチとして評価するべきである。最終細胞治療用医薬品とは全ての必要な操作ステップを経て調製されたものと規定できる。必要な操作ステップには細胞を増幅させる前の細胞の選択、増殖あるいは増殖と分化、薬理的あるいは物理的処理、精製、臨床目的に適応する表現形質をもつ細胞の選択が含ま

れる。本ガイドラインの対象とするケースでは、細胞は通常適切な凍結保存法を用いて凍結保存されたりバンク化される。

最終細胞治療用製品について、品質試験やロットリリース試験を行うと同時に製品の有効期限を評価できるような生物活性などの試験あるいは検査を行う必要がある。規格とその規格値は製造実績やプロセスバリデーションのデータに基いて設定すること。将来の解析のために使用した試料を保存することが推奨される。

生物活性を評価できるような適切な力価試験を設定するとともに、製品が目的とする状態を保持していることを担保するための安定性試験を行うべきである。細胞製品には、明瞭な表示をしておくべきである。また、細胞の同定、加工方法、製品のスクリーニング試験の結果を記録に残しておくこと。細胞製品には、十分にバリデートされた有効期限を設定すること。設定された有効期間の間、細胞が目的とする状態を保持していること、あるいは製品としての安定性が維持されていることについての実験データに基いて、有効期限が決定される必要がある。

製品の受け入れ規格に関する基準を設定するとともに必要に応じて規格を見直すこと。基準には、製品の量やサイズ、保存条件、許容温度範囲、微生物否定試験、製品以外の不純物あるいは工程由来不純物の限度値、生細胞数や機能が含まれる。細胞の凍結、解凍方法、汚染の有無や生細胞率試験の結果を記録しておくこと。もし、細胞治療用医薬品の目的とする状態が保持されていることを担保したり、品質あるいはロットごとの恒常性を解析する必要がある場合には、同時に細胞の生存率の解析を必ず行うこと。この測定を行っておくことにより、医療現場において患者への投与に先立って細胞の生存率を評価することが可能になるであろう。

細胞治療用医薬品の調製にあたっては2つの特殊なケースが想定される。

- a) 自己由来の細胞の生物学的性質を改変するような工程を経て、その工程が終了した直後に患者に再投与されるような、患者ごとに調製される細胞
- b) 原材料の細胞数が非常に限定された数しかない場合や望ましくない形質転換を避けるために採取した細胞の増殖を制限するような加工しか行わない場合で、最終製品の臨床投与への必要量が限定されている場合

これらのケースでは、出荷前に試験を完了することができない場合や出荷判定のためのサンプル量や時間が十分でないケースがしばしばある。

細胞を操作する全工程はバリデートされていなければならない。臨床に用いるのと同様な細胞調製工程に関するバリデーション・スタディを通常6ヶ月間隔といった一定期間ごとに行なう必要がある。このバリデーション・スタディには、無菌性、マイコプラズマや外来性ウイルス否定試験、細胞の確認試験、細胞の生物活性、細胞の生存率、細胞増殖能、

純度、必要に応じて遺伝子の導入効率があげられる。臨床使用の直前に、予め決められた規格限度値に対応して基本的な一連の試験（例えば、生存性、バクテリア汚染、表現型、投与あたりの細胞数）を細胞製品の臨床使用に先立って必ず行うこと。可能であれば、将来の解析のために、試料の一部を保存しておくべきである。

患者への投与直前に限定的な処理が必要な細胞製品に関しては、製品の添付文書の項にその操作手順が含まれるべきであり、製品のユーザーに必要な操作を文書化して提供する必要がある。この工程は、工程バリデーションプログラムとして評価されるべきであり、その結果は関連情報として提供される必要がある。

## 1.9 その他の補遺的事項

### 体細胞治療の例

1. 骨髄系細胞減少症 (myelodepletion) の治療や血球系の再構築を目的とした自己あるいは HLA の適合した同種血液幹細胞の投与。
2. 養子免疫療法を目的として、体外で精製、増幅、活性化やプライミングを行った活性化リンパ球や活性化樹状細胞の投与
3. 複雑な生物学的機能を持つようにデザインされ、損傷あるいは欠損した組織の原料となる可能性のある組織特異的細胞集団の移植
4. 分離、加工し、体外で生物学的操作や遺伝子改変などを行った自己由来のがん細胞
5. 幹細胞治療：万能性の血液幹細胞は、全ての血球細胞と免疫系の始原細胞集団であり、癌や自己免疫疾患あるいは遺伝病の治療を目的とした *ex vivo* 遺伝子治療の非常に有用なターゲットとなっている。

以上のように、EU のガイドラインはヒト体細胞を用いる細胞治療用医薬品を対象としている点は我が国と共通しているが、培養皮膚等の細胞治療用製品は EU では医療器具に属している点は、我が国のガイドラインの対象範囲とは異なっている。さらに、EU では、細胞治療用医薬品の対象となるのは生きて体細胞を投与する場合と規定されており、この点も我が国の規制とは異なっている。一方、我が国では、異種由来細胞を用いた細胞治療についても今後検討することになっており、この点は EU と大きく異なる点である。

また、EU では細胞治療用医薬品の規制において、(1)ウイルス等の感染症伝達の防止、(2)品質の確保を担保するような製品の品質基準の設定、(3)製品の一定性を担保する製造方法の恒常性等を最も重視している。細胞・組織加工医薬品を自己由来か非自己の細胞かでその品質や安全性確保の方策を分けて考える点は各国共通の認識であることが明らかになった。さらに、ウイルスのスクリーニング試験法のあり方等、共通することが多いが、いくつか異なる点も明らかになった。

## 2. 遺伝子治療用医薬品の品質・安全性確保に関する国際的動向—レトロウイルスベクターに混入する増殖性レトロウイルス検出法の検討—

疾病の治療を目的として遺伝子または遺伝子を導入した細胞を人の体内に投与する遺伝子治療は、バイオテクノロジーやゲノム科学の進歩を基礎にした革新的な医療技術として期待されている。遺伝子治療は先天性の遺伝性疾患や悪性腫瘍など、現在有効な治療法が確立されていない疾患に対して画期的な治療法となることが期待されるばかりでなく、いわゆる成人病などのより一般的な疾患に対しても応用が検討されている。しかし、遺伝子治療はまだ治療法として確立されたものではなく、実験的医療の段階である。遺伝子治療に用いられる遺伝子治療用医薬品は従来の医薬品にはない画期的な作用機序による治療効果が期待される一方で、新技術の利用に起因する安全性に関する危惧も否定できない。遺伝子治療の実用化を推進するためには遺伝子治療用医薬品の品質、安全性の確保、使用段階での安全性の確保が重要となる。遺伝子治療のように学問・技術が急速に進歩している分野においては、特にこれらの医薬品の開発、臨床研究の進展が著しい外国での学問・科学の進歩を踏まえ、国際的な水準からみた安全性確保方策の科学的妥当性について絶えず評価・検証する必要がある。

本研究は、以上のような現状を踏まえ、遺伝子治療に関する国際的動向、安全性確保方策の進展を検討し、我が国の遺伝子治療用医薬品の品質、安全性の確保に寄与する基礎的研究を行うものである。本年度は昨年度検討したウイルスベクターの品質面での安全性確保の国際的動向を踏まえ、レトロウイルスベクターの品質管理、安全性確保上最も重視されるベクターに混入する増殖性レトロウイルス (Replication-competent retrovirus; RCR) の検出法について検討を行い、ポリエチレンイミン (PEI) 結合磁気ビーズを用いたウイルス濃縮法を Infectivity RT-PCR と組み合わせることにより、従来の方法よりも短時間で高感度に検出できる可能性を検討した。

### 2.1 リアルタイム定量 RT-PCR による RCR 測定の定量性

まず、リアルタイム定量 RT-PCR による RCR 定量の条件検討を行った。RCR の 10 倍希釈系列を DMEM 培地を用いて調製し、各 100  $\mu$ l より EX R&D を用いてウイルスゲノム RNA を抽出し、50  $\mu$ l の水に溶解した。このうちの 10  $\mu$ l を用いてリアルタイム定量 RT-PCR を行った。用いた forward、reverse プライマーおよび TaqMan プローブは、RCR ゲノムに含まれるがレトロウイルスベクターでは欠損している AMLV 4070A env の配列を認識するように設計したものである。リアルタイム定量 RT-PCR 増幅プロットにおいて、TaqMan プローブの蛍光シグナルが一定の閾値を越えたサイクル数 (threshold cycle; Ct) と、ウイルス希釈列 100  $\mu$ l に含まれる RCR 量より得られた検量線を Fig.3 に示

す。標準曲線はウイルス希釈列 100  $\mu$ l 中に含まれる RCR が  $10^6$  ffu $\sim$ 0.1 ffu の広範囲にわたり極めて良好な直線性を示し、相関係数は 0.998 であった。繰り返し実験を行っても極めて再現性のよい結果が得られた。RCR 量が 0.1 ffu 以下ではリアルタイム定量 RT-PCR で正常な増幅プロットが得られず Ct 値を求められなかったことから、この方法による RCR 定量の検出限界は 0.1 ffu であることがわかった。

## 2.2 PEI-磁気ビーズによる RCR の濃縮

試料中にごく微量に存在する RCR を定量する場合、RCR の濃縮が可能であれば、検出感度を上げられることが予想される。しかし、レトロウイルスでは、超遠心や PEG 沈殿などでは有効なウイルス濃縮はできない。そこで本研究では、エンベロープウイルスが PEI-磁気ビーズにより濃縮可能であるという知見 (Yamaguchi T. et al., J. Clinical Microbiology 投稿中) を参考に、RCR の濃縮にも PEI-磁気ビーズが有効かどうかを検討した。RCR を DMEM 培地で  $10^5$  希釈したウイルス液 1ml, 10ml を調製し、PEI-磁気ビーズ 100  $\mu$ l を用いて、PEI-磁気ビーズ吸着画分と磁気ビーズ処理上清画分に分画した。各画分および未処理ウイルス液 100  $\mu$ l より抽出したウイルスゲノム RNA について、RT-PCR を実施後、アガロースゲル電気泳動で分析したところ、Fig.4 に示すように、PEI-磁気ビーズ吸着画分では、AMLV 4070A env の増幅により得られる 64bp のウイルスバンドが検出されたが、磁気ビーズ処理上清中からは検出されなかった。また、濃縮するウイルス液の量を 1ml から 10ml に増やすと、PEI-磁気ビーズ画分に回収されるウイルスゲノムの量も増加したことから、PEI-磁気ビーズにより RCR が濃縮可能であることが明らかとなった。そこで、PEI-磁気ビーズによる RCR 濃縮を定量的に解析するため、RCR を DMEM 培地で 10 倍希釈系列とし、各 1ml, 10ml より PEI-磁気ビーズで分画を行った後、リアルタイム定量 RT-PCR を実施した。その結果、試料中の RCR 量が多い場合には、PEI-磁気ビーズに吸着しきれない RCR が磁気ビーズ処理上清画分に検出されたが、試料中の RCR 含量が低い場合には、RCR は良好に PEI-磁気ビーズに吸着回収されることがわかった (Table 4)。ウイルス液 100  $\mu$ l から直接 RCR のゲノム RNA を抽出した場合と比較して、ウイルス液 1ml, 10ml から PEI-磁気ビーズにより RCR を回収することにより、RCR はそれぞれ約 10 倍、100 倍に濃縮され、また 1ml 濃縮、10ml 濃縮では、RCR 検出感度がそれぞれ約 10 倍、100 倍に上昇した (Table 4, Fig.5)。

## 2.3 ウイルスベクターに混入する RCR の測定

RCR の実際の測定においては、高濃度のレトロウイルスベクターに微量に混入する可能性のある RCR を定量的に検出する必要がある。そこで、レトロウイルスベクターに RCR をスパイクした場合にも、リアルタイム定量 RT-PCR による RCR 定量や PEI-磁気ビーズによる RCR の濃縮が可能かどうか

を検討した。レトロウイルスベクターとしては  $\Psi$  CRIP-LEGFP1 培養上清 (ベクタータイター約  $1 \times 10^6$  colony forming units/ml) を用いた (Fig.6)。LEGFP1 ベクター上清を用いて RCR の 10 倍希釈列を調製し、各 1ml, 10ml を PEI-磁気ビーズで分画後、各画分より抽出した核酸試料を用いてリアルタイム定量 RT-PCR を行った。その結果、RCR を 1000ffu/ml から 0.001 ffu/ml まで希釈しても PEI-磁気ビーズ吸着画分に得られる RCR 量はほとんどかわらず、LEGFP1 ベクター上清にスパイクした RCR 量よりも多い約 700ffu (試料 1ml) 及び約 10000ffu (試料 10ml) という値が得られた (Fig.7)。さらに RCR をスパイクしていない LEGFP1 ベクター上清からも同程度の RCR が検出されたことから、今回用いたベクター上清中に、RCR 検出用 RT-PCR に反応する核酸が含まれていることが判明した。しかし、RCR の検出に用いた 4070A AMLV env を認識するプライマー、プローブセットは遺伝子組換えが生じない限りベクターとは反応しないものである。またベクター上清についてウイルス学的 RCR 試験法である PG4(S+L) フォーカスアッセイで調べたが、RCR は検出されることが確認された (data not shown)。さらに、ベクター上清及びパッケージング細胞株の  $\Psi$  CRIP-P131 培養上清より核酸を抽出し、4070A AMLV env を認識する同一のプライマー、プローブセットを用いて RT-PCR 及び PCR を行い、5%アガロースゲル電気泳動で分析した結果、両試料から同一サイズの RT-PCR 増幅バンド及び PCR 増幅バンドが検出された (Fig. 8)。このとき RCR から抽出した核酸試料では、RT-PCR 増幅バンドは認められたが PCR 増幅バンドは検出されなかった。以上の結果は、 $\Psi$  CRIP-P131 細胞及び  $\Psi$  CRIP-LEGFP1 細胞の培養上清中にベクターをパッケージングするために組み込まれている 4070A AMLV env 領域を含む DNA が、RCR に換算して数百 ffu/ml に相当する量、混入してきていることを示唆するものであり、これが RT-PCR による RCR 検出の際に、高バックグラウンドとして検出されたことが判明した。したがって、このようなベクター上清中の RCR を、直接リアルタイム定量 RT-PCR で測定することはできないことが明らかとなった。

## 2.4 RCR のウイルス感受性細胞による増幅と定量

LEGFP1 ベクター上清を、直接リアルタイム定量 RT-PCR による RCR 測定用の試料として用いることができないことから、ベクターに混入する RCR を測定するためには、RCR と非増殖性のレトロウイルスベクター、及び混入 AMLV env DNA との分離操作を行う必要がある。そこで、ウイルス感受性細胞に RCR を含む試料を感染させ、増殖性を有する RCR のみを増幅させた後に RT-PCR を実施することにより、RCR をベクター及びベクターに混入する AMLV env DNA の影響を抑えて測定できる可能性について検討した。このように、ウイルス感受性細胞でのウイルス増幅後に RT-PCR を行う方法を Infectivity RT-PCR と呼ぶ。

まず、RCR を FCS 含有 DMEM 培地で希釈したウイルス希釈系列各 1ml を、ポリブレン 8  $\mu$ g/ml 存在下、Mus dunni 細胞に感染させた後、経日的に培養上清を回収し、PEI-磁気ビーズ濃縮後にリアルタイム定量 RT-PCR を行い、RCR 増幅の容量反応性を検討した。その結果、Mus dunni 細胞に感染させた RCR 量が 10 及び 100ffu/dish の場合、各濃度 3 枚の dish 全てにおいて感染 2 日目から RCR の増幅が検出され、7 日目まではほぼ直線的な増幅が検出された (Fig.9, Table 5)。感染 RCR 量が 1 及び 0.1ffu/dish の場合は、3 日目までは増幅が検出されないが (Fig.9A)、4 日目以降になると dish 間のばらつきが大きいものの増幅が認められた (Fig.9B, table 5)。RCR 量が 0.01ffu では増幅は検出されなかった。したがって、感染 4 日目以降に測定することで 0.1 ffu/ml 以上の RCR が検出可能と考えられた。同一試料について、従来の RCR 検出法である直接 PG4(S+L-)フォーカスアッセイを行い、7 日目に顕微鏡観察を行ったところ、100ffu では 100% のウェルでフォーカス形成が検出されたが、10ffu では検出されないウェルも認められた (Table 5)。したがって、Infectivity RT-PCR と PEI-磁気ビーズ濃縮を組み合わせることにより、検出感度は 10 倍以上、場合によっては 100 倍程度まで高めることが可能なこと、PG4(S+L-)フォーカスアッセイよりも短時間で RCR が検出可能なことが判明した。

そこで、RCR を LEGFP1 ベクター上清にスパイクした場合についても、同様の結果が得られるかどうかを検討した (Fig.10, Table 6)。Mus dunni 細胞に感染後、5 日目及び 10 日目に RCR の測定を行ったところ、感染に用いたベクター上清には、RCR で約 400ffu/ml に相当する AMLV env DNA が混入していたが、感染後の培養上清からは検出されなかった。一方、ベクター上清にスパイクした RCR については、感染 5 日後の培養上清を直接リアルタイム定量 RT-PCR で測定した場合、3ffu 以上で RCR の増幅が濃度依存的に検出され、Mus dunni 培養上清を PEI-磁気ビーズを用いて濃縮すると、1ffu でも増幅が検出された (Fig.10)。さらに、感染後 10 日間培養し、PEI-磁気ビーズ濃縮した場合には、0.3ffu でも検出された。同一試料を直接 PG4(S+L-)フォーカスアッセイで測定した結果、100% の検出感度を得るには 100ffu が必要であったが、Mus dunni 増幅、PEI-磁気ビーズ濃縮後、リアルタイム定量 RT-PCR を実施した場合には、3ffu でも 100% 検出された (Table 6)。1dish(1well)でも反応が得られた濃度と比較すると、5 日間培養ではフォーカスアッセイと変わらなかったが、10 日間培養では 3 倍高感度となった。したがって、ウイルスベクターに混入する RCR の検出についても、Infectivity RT-PCR と PEI-磁気ビーズ濃縮を組み合わせることによって、従来の RCR 検出法よりも短時間で高感度に RCR を検出可能なことが明らかとなった。

### 3. バイオテクノロジー医薬品の製造法変更時の品質確保、同等性/同質性(Comparability)評価

バイオテクノロジー医薬品は開発に通常 10 年単位の時間を必要とする。一方、分子生物学、生化学、たん白質化学、分析化学、細胞生物学領域の技術革新は目覚しく、バイオテクノロジー医薬品の製造技術においても医薬品開発期間中に様々な新技術が開発、導入される。したがって一度設定した製造方法についても、規制当局から承認を受け市販された後、(あるいは開発期間中においても) 製造方法の変更が望まれることが少なくない。しかしながら、製造承認、あるいは輸入承認は、当初の製造方法によって製造された製品に関して得られたデータに基づいて評価した結果であり、製造方法変更後の医薬品の有効性および安全性について保証するものではなく、新しい製法による製品の有効性、安全性を保証する検討が必要と考えられる。とはいえ、製造方法の変更を行なった製品の有効性および安全性を評価するために、新薬と同様のデータを求めることは、優れた薬の安定的供給を図る意味からも、また社会的な資源の節約という意味からも合理的とはいえない。また、製造方法の変更はしばしば医薬品の品質の改善に結びつき、安全性の観点からも好ましいケースが少なくないが、変更の際し、その影響を評価する上で重要でないデータを求めることは、好ましい変更を妨げる要因にもなりうる。そこで現在、これらの医薬品の製造方法の変更時の評価法について、検討が求められている。

バイオテクノロジー医薬品のほとんどは有効成分である目的物質においても本質的に分子多様性 heterogeneity があり、また製造技術が多様であるため、それに応じた不純物、混入物の解析が必要となる。したがって、製造工程の変更が医薬品の安全性、有効性に及ぼす影響を評価するためには、このような視点からも合理的に評価する必要がある。

本研究は以上のような現状を踏まえ、この分野の国際的動向を研究し、我が国におけるバイオテクノロジー医薬品の製造方法の変更の評価法を定めるための基礎資料を提供するために行なった。初年度は主として過去数年でこの分野の評価法を整備しつつある米国に焦点をあて、我が国における評価の現状との比較を行なった。今年度はさらに欧米、特に欧州における最新情報や文献、および欧米の専門家との意見交換を基に、現時点での論点を明らかにするとともに、国際調和を考慮した製造方法の変更時の製品の品質・有効性・安全性評価法のあり方についてまとめた。

#### 3.1 欧州における Comparability の議論の経過

##### 3.1.1 組換え DNA 技術を利用して製造された医薬品のガイドライン

欧州においても、日本や米国と同様に製造方法が変更されたバイオテクノロジー応用医薬品の同等性/同質性評価法に関する議論は、活発に行われてきた。すでに問題提起は、1995 年 7 月に施行された CPMP ガイドライン「組換え DNA 技術を利用して製造された医薬品の生産と品質管理：Production and Quality of Medicinal Products Derived by

Recombinant DNA Technology」の中でもなされており、「生産について考慮すべきポイント」の中で「実験室での開発段階から実生産スケールでの生産にいたる培養工程や精製工程でのスケールアップの間に、立体構造、生産量や不純物の質的、量的変化といった製品の品質に影響がおよぶことがあるかもしれない。したがって、それぞれの段階の製造時に、十分な工程内管理試験および品質管理試験が必要とされる」という記述がなされている。しかしこのガイドラインの中では評価の具体的な考え方については触れていない。

### 3.1.2 モノクローナル抗体の生産と品質管理に関するガイドライン

一方、上記のガイドラインと平行して、1995年7月に施行されたCPMPガイドライン「モノクローナル抗体の生産と品質管理：Production and Quality Control of Monoclonal Antibodies（川西、資料1）」の中では、モノクローナル抗体の同等性/同質性の評価について、一章を割いてさらに踏み込んだ記述がなされている。

このガイドラインの中で、臨床試験あるいは認可の手続き中にモノクローナル抗体の製造方法が変更された場合、例えば糖鎖の変化によって、同様の特異性は有するが、異なった分子の抗体に変化する場合があることを指摘している。このような製造方法の変更の例として、インビボ製造法からインビトロ製造法への変更、培養工程あるいは培養条件の変更、精製工程の変更、モノクローナル抗体の追加的修飾があげられる。このような製造方法の変更を導入した場合、製造方法の変更の前後で抗体が同等/同質であることを示すために、以下のような同等性を証明するための検討を行うべきとしている。

#### (1) 製品の同等性に関するインビトロ研究

アイソタイプ、サブクラス、多様性、分子量、一次構造、二次構造、グリコシル化のパターン、構造のインテグリティといった、モノクローナル抗体の物理的・化学的特性を解析し、比較する。生物学的特性では、免疫学的活性および交差性、関連する機能特性の測定、抗原等との親和性を測定するための結合実験等により比較する。またマスターセルバンクの関連パラメーターの変化はないが細胞培養の工程/条件に変更が加えられたとき、形態、細胞増殖、生存率、イソ酵素、生産の安定性等を分析すべきである。

#### (2) 製品の同等性に関するインビボ研究

(1)における分析的な特性解析の結果によって、インビボ試験において選択する項目は変わる。変更前後の抗体が同等であることが、分析結果によって分かっている場合でも、少なくともファーマコキネティクス、生体内分布、半減期は測定し、比較すべきである。

#### (3) 臨床研究

(1)、(2)の比較検討によって、両方の抗体が同じ物理的・化学的特性、生物学的特性、薬理学的特

性を示すことが明らかになった場合、製造方法が変更される前の製品を用いて行われた臨床研究データを受け入れることができる。しかし、必要な前提としては、生産は同じマスターセルバンクによることである。マスターセルバンクを変更した場合は、変更後の製造方法によって製造された抗体について臨床試験を行わなければならない。

### 3.1.3 Schaffner および Giess 博士（ポールエーリッヒ研究所）による論文「製造工程の変更の導入の際に行う、治療およびインビボ診断を目的としたモノクローナル抗体の同等性研究のクライテリア」

以上のモノクローナル抗体に関するガイドラインの中の同等性に関する記述は、以下の Schaffner および Giess 博士（ポールエーリッヒ研究所）による論文「製造工程の変更の導入の際に行う、治療およびインビボ診断を目的としたモノクローナル抗体の同等性研究のクライテリア：Criteria for Investigation of the Product Equivalence of Monoclonal Antibodies for Therapeutic and in vivo-Diagnostic use in Case of Introduction of Changes in the Manufacturing Process, *Biologicals*, 23, 253-259 (1995)（川西資料2）」の提案をもとに記されたものと思われる。彼らの論文ではモノクローナル抗体の同等性/同質性評価について、具体的にどのような試験を行うべきかをさらに詳細に記している。以下はその要約である。

〔モノクローナル抗体の同等性/同質性を評価するにあたってのクライテリア〕

#### (1) モノクローナル抗体の品質および特性解析を目的としたインビトロ試験について

製造工程の変更前後の抗体の比較における前提は、まずインビトロ試験によって抗体の物理的・化学的特性、生物学的特性を完全に解析し比較することである。以降行われるインビボ試験のデザインと範囲はこのインビトロ試験の程度とこれらの試験によって明らかになる同等性/同質性の程度に依存する。さらに、変更された製造段階の検証を行うべきである。製造工程の検証と品質管理試験によって、製造の一定性と最終製品の一定性が示されるべきである。

#### (2) シードロットの品質と特性試験について

新しい製造場所での製造環境下では、特に新しい製造環境および品質管理下でのシードロットの品質を確認する必要がある。このことはハイブリドーマの安定性を試験することで成し遂げられる。

#### (3) インビトロ試験によるモノクローナル抗体の品質と特性試験について

抗体の物理的・生化学的同等性を評価する試験法は以下の通りである。

免疫グロブリンのクラスおよびサブクラスを決定する方法としては、特異的抗体を用いた免

疫電気泳動法、免疫拡散法、ELISA 法が確立されており、広く使用されている。

SDS-PAGE は電気泳動法として抗体分子全体、軽鎖および重鎖の組成の特性解析に広く用いられている。抗体のバンドの典型的なパターンは分子量と分子の荷電にしたがって、ゲル中を泳動することによって生じる。還元条件では軽鎖と重鎖が分離しないのに対し、非還元条件では抗体分子全体を解析することができる。試験は製造方法の変更前後の製品の比較によって行うべきである。

限外ろ過クロマトグラフィーは分子量および不純物に関する情報を得るばかりでなく、免疫グロブリン（二量体と多量体）の凝集に関する情報を得るためにも有益な解析法である。不純物が免疫グロブリンのピークと重なっている場合は、イオン交換クロマトグラフィーが分離に有用である。

N 末端および C 末端アミノ酸配列分析およびペプチドマッピングは抗体の一次構造の類似性をみるのに有用な解析法である。円偏光二色性では二次構造の解析のために有用な情報を得ることが可能で、水解後のアミノ酸組成の測定によって単一抗体に関する特徴的な値を得ることができる。円偏光二色性およびアミノ酸組成分析では、分子の大きな物質的变化のみを観察することができるが、製造方法の変更の前後の抗体分子同士を比較することにより、有用な補助的データを得ることができる。後者二つの方法は、日常的な分析に有益であるが、より感度の高い方法に置き換えていくべきである。

等電点電気泳動法は等電点を利用してタンパク質の特性解析を行う。微小な荷電の変化によって、モノクローナル抗体は一連の非常に近接したスペクトル状のバンドを示す。バンドの変化は糖の付加あるいは他の翻訳後修飾の変化を示唆する可能性がある。マイクロレベルの分子多様性の変化を検出するには比較する抗体のスペクトルのタイプを比較すべきである。

糖鎖パターンの解析には多くの方法が利用可能である。特異的モノクローナル抗体、NMR 法、加水分解したオリゴ糖のクロマトグラフィーによる特性解析、タンパク質と糖鎖間の結合の同定、レクチンによるプロットティング、シアル酸の同定、単糖の化学分析は有用な方法といえる。

培養法、精製法、製剤化の工程の変更はタンパク質の凝集やフラグメント化を引き起こしうる。それゆえ、製法の変更が製品の構造には影響しないことを示すべきである。変更された製造工程によって製造された抗体の分子状態を確認するため、製品中の凝集体（多量体）、二量体、フラグメントを検出する試験を行うべきである。方法にはカラムクロマトグラフィー（イオン交換およびゲル濾過）、SDS/PAGE、そして分子多様性（等電点）試験が含まれる。

抗体分子の一次構造および立体構造の試験に

よって、工程が変更した後に生じる分子の変化が解析される。様々なパターンで付加された糖を有する抗体分子の一次構造分析および立体構造の分析は製造方法を変更した後に得られたデータと比較するために、製造方法の変更前にも実行されるべきである。

グリコシル化の役割に関しては科学的に明らかになっていることは限られており、現在発展中の分野でもある。しかし、グリコシル化は抗体分子の中で変化しやすいものであるという認識は一致している。抗体のグリコシル化は突然変異や感染によって生じるばかりでなく、培養条件の変化のような製造方法の変更によっても生じやすい。モノクローナル抗体のグリコシル化のパターンはモノクローナル抗体の生物機能、および働きに重要な役割を果たしていることを示している研究者がいる。グリコシル化のパターンの変化は、モノクローナル抗体のインビボでの体内動態にも影響しうる。

モノクローナル抗体のインビボ特性解析試験としては、製造方法の変更の前後における、抗体の生物学的性質を比較することが重要である。二つの抗体の特異性と交差反応性を確認すべきである。そのためには、標的抗原や非関連抗原を発現させた細胞や組織を用いて、免疫組織学的試験、フローサイトメトリー、あるいは ELISA 法が用いられる。

効力を比較するためには、免疫反応性の試験を行うべきである。抗体によって異なった試験系、例えば競合 ELISA、あるいは RIA、固相に結合した単離抗原の細胞への結合の検出、希釈曲線の評価、あるいはフローサイトメトリーによる競合が有用である。しかしながら、これらの測定系は臨床での使用に非常に重要である抗体の機能面の特徴についての情報が得られる方法とは考えられない。それゆえ、工程の変更、特に培養、発酵、精製工程における変更後の抗体の機能的な反応性が確認されるべきである。一般論としてモノクローナル抗体の機能的アッセイを確立するにあたっては問題が多い。しかしながら、抗体依存的細胞毒性 antibody dependent cytotoxicity、細胞毒性試験、サイトカインの放出等は、ほとんどの抗体特異性に関係する機能的な特性を評価するのに有用である。

（４）モノクローナル抗体の品質および特性に関するインビボ試験について

抗体の機能変化は、動物モデルを用いたインビボ試験によって、極めて鋭敏に測定することができる。しかし動物モデルが利用できる抗体は限られている。例えば抗腫瘍抗体の効力を試験するための担癌マウスが例としてあげられる。特異的な効力の評価に加えて、生体内分布、体内動態、安全性、および半減期については製造方法の変更後の抗体についてデータを得る必要がある。安全性を証明する種々の薬理学的/毒性

学的試験を行うか否かの決定は、インビトロ試験および動物モデル系のデータによって評価された同等性/同質性の程度を考慮にいれ、ケースバイケースに考える。

#### (5) さらなる臨床試験の必要性について

さらに臨床試験を行うかどうかの決定は、製造法を変更した時点の開発段階、および品質試験の結果に依存する。もし重要な変更が開発初期に行われたなら、新たな臨床試験を計画し、変更後の抗体の同等性/同質性を証明すべきである。開発の後期での変更に関しては、インビトロ試験および動物モデル研究による抗体の特性解析の結果を注意深く評価すべきである。製品の同等性が確認されたなら、臨床評価を追加する必要はなくなる。臨床試験をデザインするにあたっては、製造方法の変更の内容と、工程変更のモノクローナル抗体への影響を十分に考慮に入れる必要がある。

以上のCPMPガイドラインおよびSchaffnerおよびGiess博士の論文は、モノクローナル抗体製剤の同等性/同質性評価にあたってのステップバイステップ、ケースバイケースの原則を示している。即ち、製造方法の変更の前後における製品の物理的・化学的特性解析、生物学的特性解析を徹底的に行い比較し、さらに（有効な実験系が設定できる場合は）インビボでの効力試験、および体内動態の試験を行い、同等性/同質性を明らかにする。以上の試験で、同等性/同質性が否定されたり、同等/同質であることに疑念を抱かせる結果が得られたときは、さらに追加の臨床試験で比較を行うことになる。このような原則は米国FDA-CBERのPoint-to-Consider(川西資料3)、および我が国におけるこれら製剤の同等性評価の基本的立場と一致する。しかし、動物を用いたインビボ体内動態試験の必要性についてはFDA-CBERや我が国の立場とに違いがみられる。即ち、CPMPでは物理的・化学的特性解析および生物学的特性解析において違いが見出せなくともインビボ体内動態試験による比較は必要としているのに対し、CBERおよび我が国では特性解析において同等性/同質性が明らかにできた場合は、インビボ体内動態試験は特に求めてはいない。

### 3.2 CPMP バイオテクノロジー応用タンパク質を含んだ医薬品の同等性/同質性に関するガイダンスと関連情報

以上のような経過の中、CPMPでは製造法を変更したバイオテクノロジー応用医薬品の評価に関するガイダンスノート「原薬としてバイオテクノロジー応用タンパク質を含む医薬品の同等性/同質性に関するガイダンスノート：Note for Guidance on Comparability of medicinal Products Containing Biotechnology-derived Proteins as Drug Substance(川西資料4)」を公表し、2002年3月に施行した。このガイダンスノートの内容および特

徴について、ガイダンスノート作製に係った専門家との意見交換による情報を併せて、以下にまとめる。

このCPMPの同等性/同質性ガイドラインは、先のモノクローナル抗体における同等性/同質性評価をバイオテクノロジー応用医薬品すべてに適用範囲を広げて、一般化する形でまとめられている。構成としては4つの部分にわかれており、第一章にはガイドラインの目的、適用範囲が記されている。この部分にFDAのガイドラインと大きな相違があり、その後の構成の大きな違いの原因となっている。即ち、CPMPのガイドラインの目的に、「バイオテクノロジー応用製品の販売承認申請において、製造業者が既に販売されている製品と同等であることを主張する際の同等性/同質性の検討作業の必要性を考察する必要がある」と述べ、いわゆるGeneric Biologicalsもこのガイダンスノートの対象とすることを明らかにしているのに対し、FDAの同等性/同質性ガイドラインでは後発メーカーが承認申請をするような場合はガイドラインの適用範囲に含めていない（ガイドラインの中では除外するとは記されていないが、内容から考えて適用できない）。さらにFDAのガイドラインのポイントとしては「製造法の変更が行われた後でも医薬品が安全で、純度が高く、有効であることを同等性試験が示すのなら、追加の臨床試験を行わなくとも製造法の変更を行うことができる」として、全体の基調が、動物を使う前臨床試験を含めて、臨床試験を繰り返さずに製造方法の変更を認めることができる要件をまとめる、という方向にあるのに対し、CPMPのガイダンスノートは「同等性/同質性試験の科学的な手引書」としての意味合いが強い。

2つめの章は、同等性/同質性評価の具体的な記述となっている。はじめに、同等性/同質性評価にあたって考慮すべきポイントとして、(1)変更がなされるタイミング、(2)製品の物理的・化学的特性、生物学的特性等の品質上のクライテリア、(3)特性評価に用いる分析法、(4)安全性および有効性との関係、に分けて議論している。これらのポイントについては、FDAのガイダンスと内容において違いはない。

2つめの章の後半に、実際の同等性/同質性評価の作業のストラテジーに触れている。ここでCPMPのガイダンスノートは4つのケースに大きく分類している。即ち、(1)品質クライテリア（原薬および製剤の規格、および工程内管理の規格値/適否の判定基準）に影響を及ぼさない製造方法の変更、(2)原薬や製剤の規格には影響しないが工程内管理の規格値/適否の判定基準に変更が生じるような工程の変更、(3)品質クライテリア（原薬や製剤の規格と工程内管理の規格値/適否の判定基準）に影響を及ぼすが安全性/有効性には影響はないと考えられる工程の変更、(4)品質クライテリア（原薬や製剤規格と工程内管理）に影響し、安全性/有効性にも影響が予想される工程の変更、の4つのケースである。(1)と(2)の区別に関しては、工程に関連した審査が欧米と異なるシステムの我が国において、このような区別の適格性に問題はあるものの、概念的には理解しや

すい分類といえる。しかしながら、(3)と(4)の区別は(1)、(2)、(3)と異なり、実際の作業では極めて困難が予想される。したがって、申請者が実際にこのガイダンスノートを確認時に参照しても、この区別は役立たない恐れがある。さらに、我が国の基本的な立場として、規格への大きな変更が生じるような製造方法の変更、製造方法の変更によってフルセットの臨床試験による安全性、有効性評価が必要になるケースは、同等性/同質性評価の対象とはしていない。

3つめの部分は、一つの章を割いていわゆる Generic Biologicals に関して触れている。このことは、このガイドラインノートが Generic 医薬品を重視していることの現れではある。しかし最も重要な同等性/同質性評価のための臨床試験の程度について、明確な考えを打ち出さないままであり、抽象的な表現「前臨床や臨床ブリッジング研究の程度は、原薬および製剤の性質、分子構造の複雑さ、(不純物や安定性を含め、場合によっては製剤の剤形も含めた)参照物質との比較データによって左右される」に終わっている。Generic Biologicals については、米国ではバイオテクノロジー医薬品業界が、申請に必要とされる試験の簡略化に強く反対の姿勢をとっており(川西資料5)、FDA-CBERもバイオ製品については同様の方針にあるようである。一方医療制度改革の中で、医療費の軽減を求める上院議員には、Generic Biologicals の活用を求める動きがあるようであり(川西資料6)、米国ではこの問題は一部政治問題化している。とはいえ、CPMPのガイダンスノートが述べているように、Generic Biologicals の同等性/同質性評価は、科学的には、同一業者の製造方法の変更の場合の同等性/同質性評価の延長線上にあると考えられ、別のものと考えことは合理性に欠ける。欧州では Generic Biologicals についても、同等性/同質性評価の対象として扱うというのが基本方針である。我が国においても、Generic Biologics の開発を行う企業がある(あるいは、生まれる)のは現実であり、いずれ申請がなされることは確実であることから、基本的には同等性/同質性評価の対象にこれら医薬品をいれるという考え方は、欧州と一致している。

4つめの章は、以上のまとめの章である。その結論をみると、CPMPのガイダンスノートはFDAのガイダンスと逆の表現となっている。即ち、FDAのガイドラインの結論が、「同等性/同質性試験データが製造方法の変更後の製品が安全で、純度が高く、強力で有効であることを示すならば、追加の臨床試験がなくとも製造方法の変更を認めることができる」としているのに対し、CPMPのガイドラインは、「満足すべき同等性/同質性を示すことができない場合は、すべての前臨床および臨床データが必要になるであろう」となっている。この原因は、先に触れたように、FDAガイダンスが、臨床試験を極力行うことなく同等性/同質性を明らかにするための手続きのまとめであるのに対し、CPMPのガイドラインノートが同等性/同質性評価の科学的方法をまと

めるという姿勢にあることによると思われる。この点においては、我が国の立場はFDAに近い。

### 3.3 欧州における同等性/同質性評価法に関する議論の行方

以上のように、科学的なバックグラウンドは共通であるにもかかわらず、ガイダンス作成の目的が異なるため、欧州と米国では、ガイドライン作成後のフォローアップにも相違がある。FDAでは昨年度の報告にもふれたように、その後の議論は同等性/同質性評価のプロトコルを實際上、どのように作るかについての手続き上の問題に話題が移り、既に補足的ガイダンスも公表されている。一方、欧州ではガイダンスノートの中で曖昧なままになっていた部分に関する整備を目指している。即ち、(1)物理的・化学的特性および生物学的特性解析の結果、製造方法の変更の前後の製品間に違いが見出された後のアプローチ、(2)既に市販されている製品と同等であるとして申請された製品(いわゆる Generic Biologicals)に関する同等性/同質性の検討作業の具体的方法の2点である。

非公式な情報であるが、このような問題点を補うためにCPMP内部では、バイオテクノロジー応用医薬品の同等性/同質性評価の中の前臨床試験および臨床試験について、討議を開始しているようである。そこでは、

- (1) 製品間の特性解析試験において違いが見出されたり、同等/同質であることに疑念が生じた場合
- (2) 市販されている製品と同等であるとして新たな製品が申請された場合

の二つのケースにわけて、前臨床動物試験と臨床試験をどのように行うべきかの問題に関して、ガイドライン作成作業を開始していると聞く。

彼らのもう一つの問題意識は抗原性である。製造方法の変更が、特性解析試験やインビトロ機能試験で差異を見出せないような構造変化、あるいは不純物プロファイルの変化を生み、抗原性に差異が生じる可能性を危惧して、ヒトでの抗原性試験の必要性に関して議論していると聞く。

このような議論は、個々の製品の同等性評価のプロセスにおいては極めて重要な視点であり、以上の3つのテーマに関する議論からどのような新しい考え方が生み出されてくるのか注視すべきと思われる。しかしながら、どのテーマも本質的にケースバイケースの対応が必要な問題であり、具体的な道筋(方策)をあらかじめたてることは困難と思われる。したがって、同等性/同質性試験のガイドラインに組み入れようとしても、実用性に欠けた抽象的な議論に陥る可能性もある。

### 3.4 我が国における同等性/同質性評価法に関する視点

我が国においては、現状では同等性/同質性評価に関するガイドラインはない。しかしながら、バイオ医薬品の製造方法の変更については、昭和59年3月3日:薬審243号「組換えDNA技術を応用して製