

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 3)。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、ウイルスベクター中の 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。

D. 考察

現在、遺伝子治療に汎用されているレトロウイルスベクターはウイルスに由来する製品であることから安全性確保には特別の配慮が必要となる。レトロウイルスベクターとして通常は増殖性(自律複製能)を失われた欠損ウイルスを用いるが、ウイルスベクターの品質管理、安全性確保上、最も重視されるのが増殖性レトロウイルス(RCR)の混入及び遺伝子組換えによる RCR の出現である。RCR の混入を防ぐことが重要である理由は、高タイトーの RCR に汚染されたレトロウイルスベクターを用いて ex vivo で遺伝子導入した骨髄前駆細胞を重症免疫不全アカゲザル 10 頭に投与したところ、3 頭がリンパ腫を発症し、200 日以内に死亡したという報告があり、このサルリンパ腫からマウス RCR が検出されたこと、抗レトロウイルス抗体の応答の欠損とレトウイルスの長期化、疾患との相関が認められたことによる。またプロウイルスの染色体組込みによる癌遺伝子の活性化や癌抑制遺伝子の不活化の危険性も RCR の混入により高くなると考えられる。FDA は 2000 年に遺伝子治療ガイドランスの追補として「レトロウイルスベクターを用いる遺伝子治療用医薬品の増殖性レトロウイルス試験及びレトロウイルスベクターを用いた臨床試験における患者の追跡調

査に関するガイドランス」を公表し、RCR 試験の実施時期、対象、容量等を具体的に提示している。RCR 暴露の危険性に関しては限られた知見しかないこと、RCR が製造段階のどの時点でも生じる可能性があることから製造の複数の段階で試験することを求めている。このうち、レトロウイルスベクター培養上清の RCR 試験については、ウイルス感受性細胞 (Mus dunni 細胞など) により最低 5 継代培養増幅後、適切な指標細胞試験 (PG4S+L-フォーカスアッセイなど) により検出することを推奨している。しかし、このような従来の試験方法は非常に時間がかかること、指標細胞での測定は熟練を要することなどの問題があり、より有効な検出法の開発が望まれる。

本研究では RCR をウイルス感受性細胞により増幅後、PEI-磁気ビーズを用いた新規ウイルス濃縮法とリアルタイム定量 RT-PCR を組み合わせることで実施することにより、従来よりも短時間で高感度に RCR の定量が可能かどうかを検討した。(RT)PCR はわずか数コピーのウイルスゲノムを高感度に検出することが可能であるため、ウイルススクリーニング試験に多用されている。さらに最近開発されたリアルタイム定量(RT)PCR 法を用いることにより、従来は半定量的測定しか行えなかった (RT)PCR を定量的に実施可能となっている。今回の検討では、AMLV 4070A env の配列を認識するように設計した TaqMan プライマー、プローブを用いたリアルタイム定量 RT-PCR により RCR 量が 10^6 ffu~0.1 ffu の広範囲にわたり定量可能であることが示された。

しかし、(RT)PCR による測定では必ずしも感染性を持つ増殖性ウイルスだけでなく、ウイルスゲノムの破片でも検出してしまうという欠点が指摘されている。実際、今回検討したレトロウイルスベクター試料 (レトロウイルスベクター産生細胞培養上清) にはパッケージング細胞に組み込んである AMLV env 遺伝子配列を含む DNA が混入していることが判明し、ベクター試料にスパイクした RCR を直接 RT-PCR により定量測定するこ

とは不可能であった。また、PEI-磁気ビーズ処理を行い RCR 及びレトロウイルスベクターを回収してもやはり混入 DNA が検出された。これは DNA そのものが PEI に吸着性を示すためと考えられる。したがって、RCR の定量には何らかの方法で増殖性を示す RCR のみを分離することが必要となる。

そこで Infectivity (RT)-PCR、すなわち、ウイルス感受性細胞に感染させることにより、感染性を有するウイルスのみを増幅後、(RT)-PCR で定量する方法の利用を検討した。感受性細胞による RCR の増幅は RCR 検出の感度を増加させる方法としても広く用いられているが、RCR 増幅後、指標細胞によるアッセイを行う代わりに RT-PCR を実施すると、従来よりも短時間で RCR を検出可能であり、また感受性細胞により未知試料の RCR を増幅する際、RCR 標準品の増幅も並行して行うことにより、未知試料に含まれる RCR の量を定量測定することが可能と考えられる。ここでさらに、増幅された RCR を含む大量の培養上清の一部を直接 RT-PCR にかけるかわりに培養上清中に微量に増幅された RCR を濃縮して RCR 全量を測定にかけることが可能であればより高感度定量が可能と考えられる。レトロウイルスの場合、超遠心、ポリエチレングリコール(PEG)沈殿などでは有効なウイルス濃縮が行えず、また超遠心は時間がかかること、PEG は PCR による測定が阻害されるなど、今回の目的にはそぐわない。そこで、本研究では PEI-磁気ビーズを用いた新規ウイルス濃縮法がエンベロープウイルスを濃縮可能であるという知見をもとに RCR 希釈液の濃縮を検討し、RCR の場合でも PEI-磁気ビーズ濃縮が有効であり、RCR 希釈液 10ml からの濃縮では検出感度が約 100 倍となることを見出した。

そこで、実際に *Mus dunni* 細胞に感染後、培養上清を PEI-磁気ビーズ濃縮し、リアルタイム定量 RT-PCR を行ったところ、培地で希釈した RCR を *Mus dunni* 細胞に 10ffu 以上感染させた場合、感染 2 日目以降で RCR の直線的な増幅が検出

され、1ffu, 0.1ffu でも 4 日目以降では増幅が検出される場合が認められた。従来の RCR アッセイでは 7 日間程度の培養期間が必要であり、100%RCR を検出するには 100ffu 必要であることから、従来よりも短時間で RCR 検出、および 10 倍以上の高感度化が達成された。1ffu/ml, 0.1ffu/ml という低濃度の RCR の場合、感染させた RCR 溶液に RCR が含まれるか含まれないかのばらつきが生じるため、dish により増幅が検出される場合とされない場合が生じるものと思われる。また、実際の RCR 測定を模したレトロウイルスベクター試料中にスパイクした RCR について検討を行ったところ、感染 5 日後では 1ffu 以上で増幅が検出され、10 日間培養すると 0.3ffu でも検出可能という結果が得られた。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って、従来よりも短時間で高感度に増殖性ウイルスを定量可能であることが明らかとなった。しかし、*Mus dunni* 細胞で増幅した培養上清中の RCR の PEI-磁気ビーズ濃縮は、RCR を培地で希釈した溶液から濃縮した場合と比較して検出感度の増加があまり認められなかった。この理由として、*Mus dunni* 細胞で一つの感染性ウイルスが感染して増幅されるのに必要なウイルス量は一定であるため、それ以降の段階で検出感度を高めようとしても限度があることが考えられる。また、細胞培養上清中に RCR 以外にも PEI-磁気ビーズに結合する DNA やその他の物質が含まれており濃縮が完全ではない可能性も考えられる。アッセイ全体の検出感度をさらに高感度化するには別の RCR 検出法の開発が必要かもしれない。

レトロウイルスベクターの臨床での使用法は *in vivo* 投与よりも *ex vivo* で遺伝子を導入した細胞を投与する場合がほとんどと考えられる。今回はレトロウイルスベクターによる遺伝子導入細胞の RCR に関する検討は行わなかったが、遺伝子導入細胞が RCR に感染しているかどうかについては、その培養上清に対して

PEI-磁気ビーズ濃縮、リアルタイム定量 RTPCR を実施することで従来法より感度よく検出することができると考えられる。また、今回の方法では 4070A AMLV env を含む RCR の検出しかできないが、目的とする RCR が PEI-磁気ビーズに吸着濃縮される場合、目的 RCR が検出されるような PCR プライマー、TaqMan プローブを設計すれば、どのような RCR にも応用できる方法と考えられる。さらに、予備的検討の結果、増殖性アデノウイルスも PEI-磁気ビーズにより濃縮が可能であったことから、増殖性アデノウイルスの検出にも応用可能であることが期待される。

E. 結論

レトロウイルスベクターの品質・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 (RCR) の検出法について検討を行った。レトロウイルスベクター試料をウイルス感受性細胞に感染後、培養上清中に増幅された RCR を PEI-磁気ビーズによる新規ウイルス濃縮法で濃縮し、エンベロープ(env)遺伝子配列に対するプライマー、プローブを用いたリアルタイム定量 RTPCR を行うことにより、従来の指標細胞を用いた RCR 検出法と比較してより短時間でより高感度に混入 RCR の定量的測定が可能であることを明らかにした。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Zhi-Li XU, Hiroyuki MIZUGUCHI, Akiko ISHII-WATABE, Eriko UCHIDA, Tadanori MAYUMI, Takao HAYAKAWA: Optimization of transcriptional regulatory elements for constructing plasmid vectors. *Gene*, 272, 149-156

(2001)

- 2) Naoya KOIZUMI, Hiroyuki MIZUGUCHI, Tetsuji HOSONO, Akiko ISHII-WATABE, Eriko UCHIDA, Naoki UTOGUCHI, Yoshiteru WATANABE, Takao HAYAKAWA: Efficient gene transfer by fiber mutant adenoviral vectors containing RGD peptide. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1568, 13-20 (2001).
- 3) Zhi-Li XU, Hiroyuki MIZUGUCHI, Akiko ISHII-WATABE, Eriko UCHIDA, Tadanori MAYUMI, Takao HAYAKAWA: Strength evaluation of transcriptional regulatory elements for transgene expression by adenovirus vector. *Journal of Controlled Release*, in press (2002).
- 4) Hiroyuki MIZUGUCHI, Naoya KOIZUMI, Tetsuji HOSONO, Akiko ISHII-WATABE, Eriko UCHIDA, Naoki UTOGUCHI, Yoshiteru WATANABE, Takao HAYAKAWA: CAR- or αv integrin-binding ablated adenovirus vectors, but not fiber-modified vectors containing RGD peptide, do not change the systemic gene transfer properties in mice. *Gene Therapy*, in press (2002).

2. 学会発表

- 1) Eriko UCHIDA: "Quality and Safety of Gene Therapy Products in Japan." Meeting on Biotech and Gene Therapy Products, ICH Tokyo meeting 2001 (2001.5)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

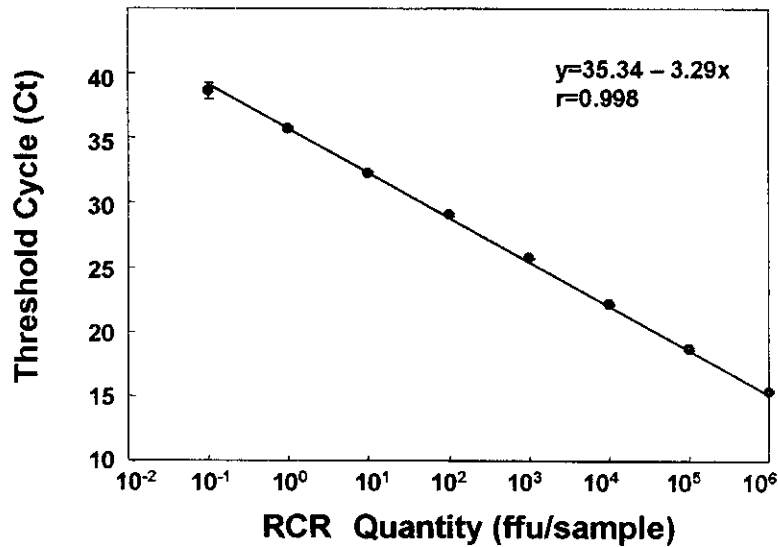


Fig.1 Standard curve for the determination of RCR quantity generated from amplification plot of real-time quantitative RT-PCR. Viral genome RNA were extracted from serial log dilution of RCR standard, and amplification of each sample were performed by real-time quantitative RT-PCR. Data were the mean \pm S.D. of triplicate amplification.

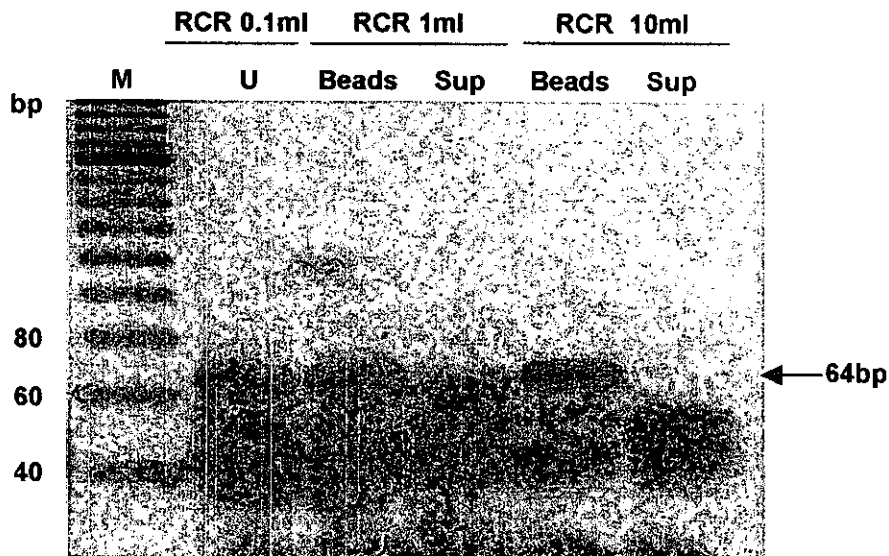


Fig.2 Adsorption of RCR by PEI-magnetic beads. RCR (10⁻⁵ dilution) were fractionated with PEI-magnetic beads. Viral genome RNA extracted from beads and beads-treated supernatant fraction were amplified with RT-PCR and analyzed by 5% agarose gel. M: 20bp DNA ladder; U: untreated RCR solution; Beads: beads-adsorbed fraction; Sup: beads-treated supernatant fraction.

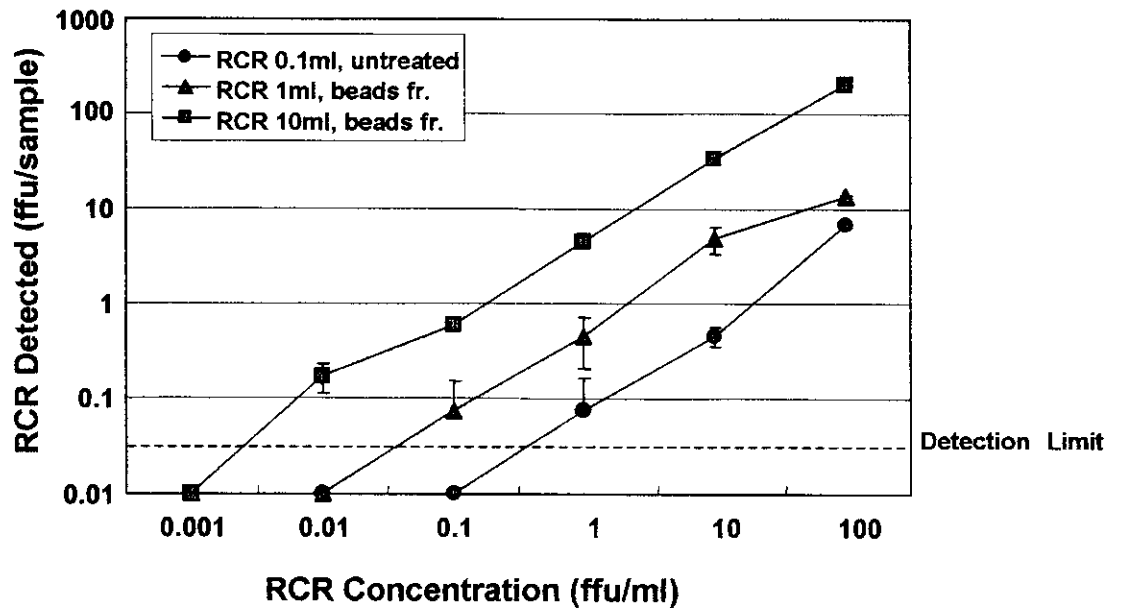


Fig. 3 Concentration of RCR by PEI-magnetic beads. One milliliter or 10ml of serial dilution of RCR solution were incubated with PEI-magnetic beads. Viral genome RNA were extracted from beads-adsorbed fraction and untreated RCR solution. Amount of RCR were determined by real-time quantitative RT-PCR.

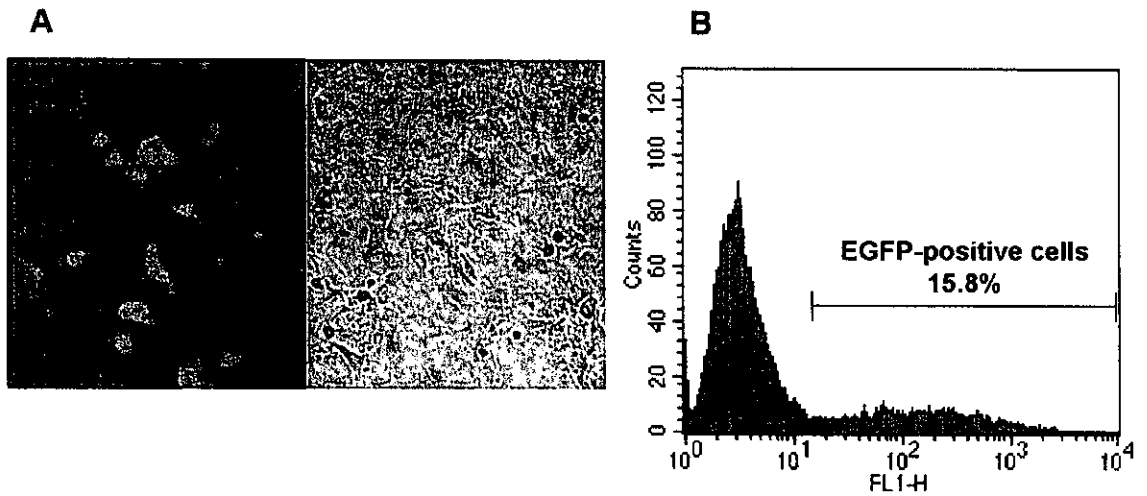


Fig. 4 Expression of EGFP by LEGFP1 retrovirus vector. Mus dunni cells were infected with LEGFP1 retrovirus vector. Three days after infection, EGFP expression were analyzed.
 A. Confocal laser-scanning detection of EGFP expression.
 Left:EGFP expression; Right: DIC
 B.Flow cytometric analysis of vector titer by evaluation of EGFP expression.

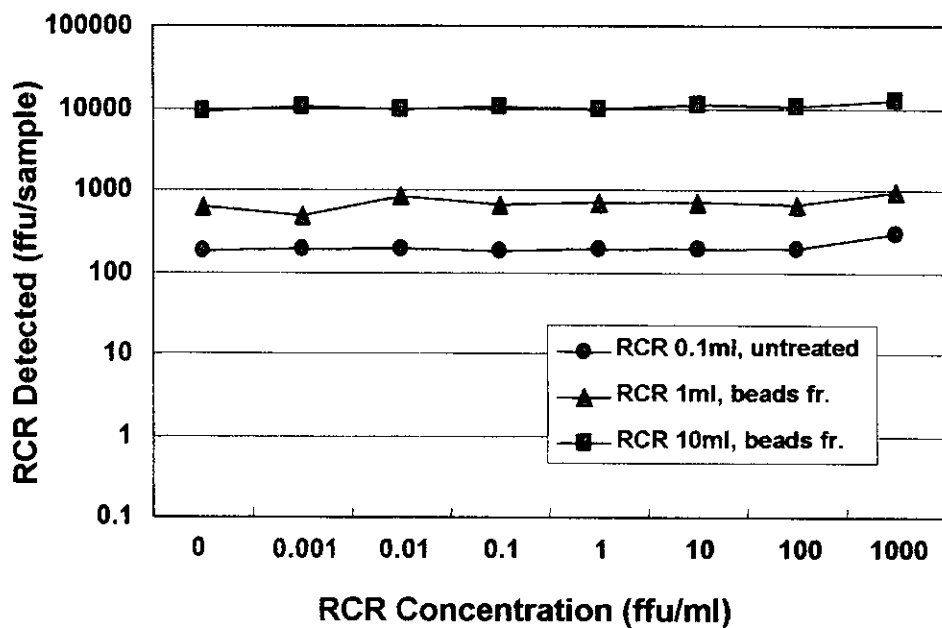


Fig.5 Concentration of RCR in retrovirus vector sample by PEI-magnetic beads. One milliliter or 10ml of RCR solution diluted with LEGFP1 retroviral vector sample were incubated with PEI-magnetic beads. Viral genome RNA were extracted from beads-adsorbed fraction and untreated RCR solution. Amount of RCR were determined by real-time quantitative RT-PCR.

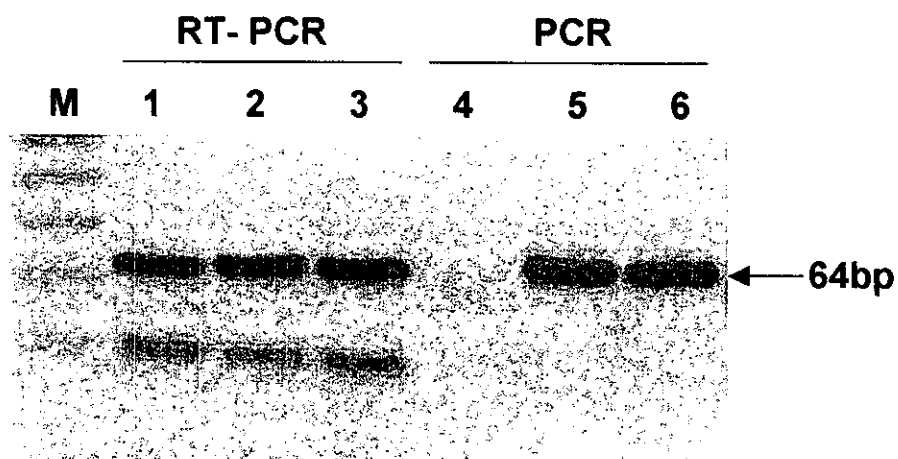


Fig.6 Detection of 4070A AMLV env DNA in retroviral vector sample. Nucleic acids were extracted from RCR 100ffu (lane 1, 4), Ψ CRIP-LEGFP1 retrovirus producer cell culture supernatant (lane 2, 5), and Ψ CRIP-P131 retrovirus packaging cell culture supernatant (lane 3, 6). RT-PCR and PCR were performed using the same primer set for the detection of AMLV env sequence. M: 20bp DNA ladder.

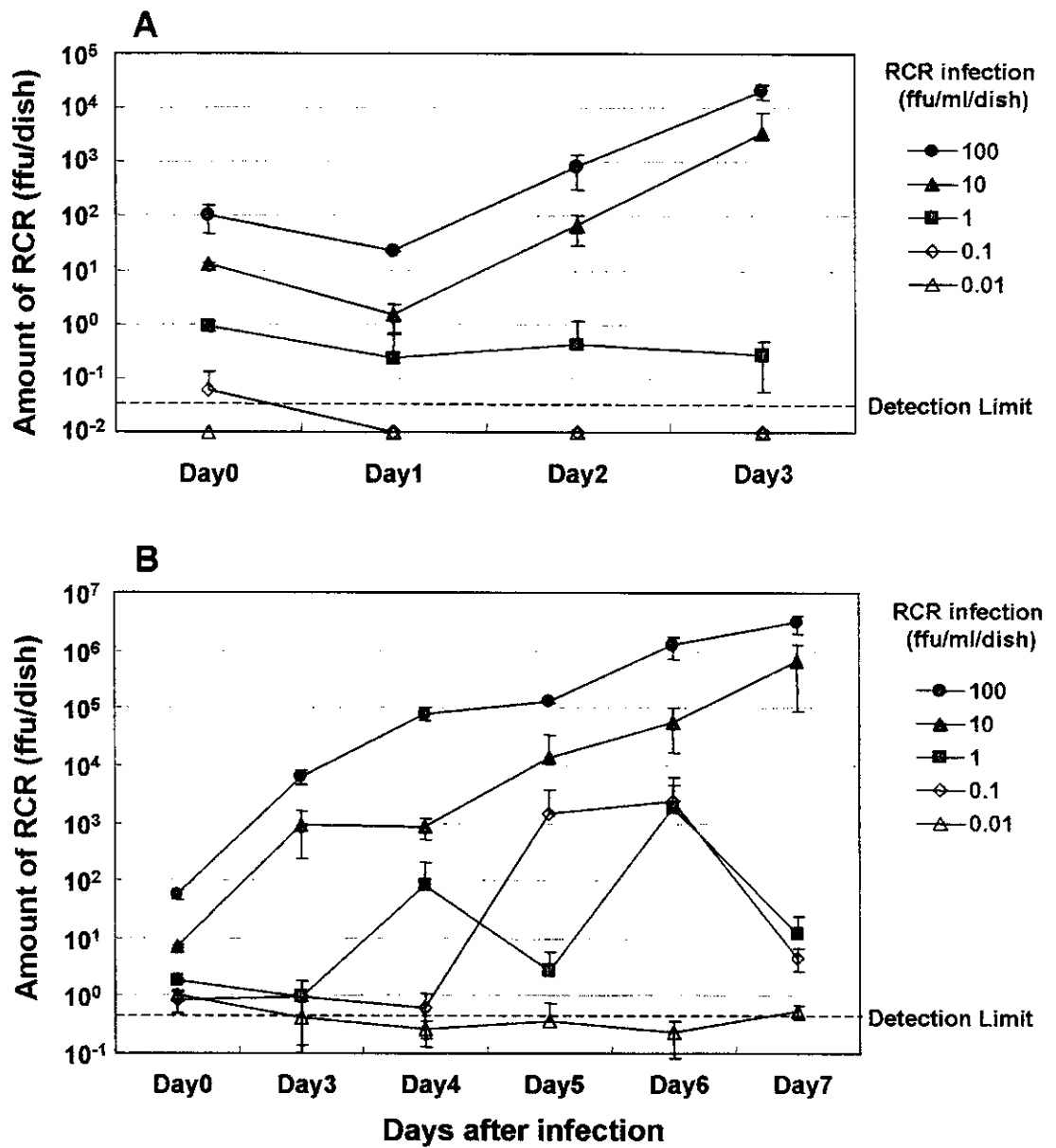


Fig.7 RCR growth curve in *Mus dunni* cells.
Mus dunni cells were infected with serial log dilution of RCR standard. Culture supernatant were harvested at indicated time, and RCR were concentrated by PEI-magnetic beads. Viral genome RNA were extracted and amount of RCR were determined by real-time quantitative RT-PCR. Data were the mean \pm S.D. (n=3)

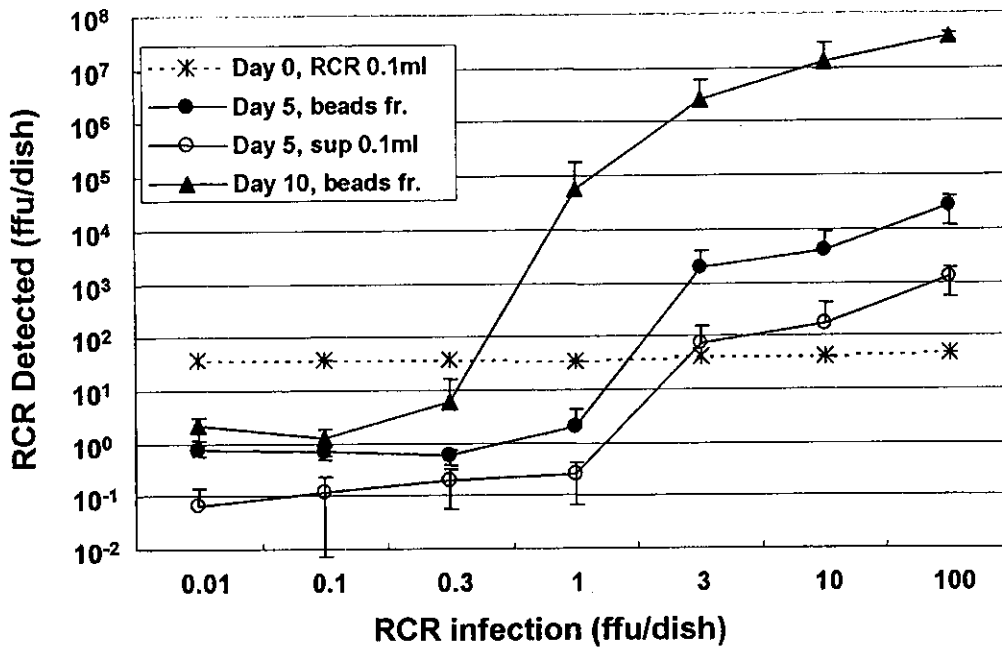


Fig.8 Detection of RCR in retroviral vector sample by infectivity RT-PCR and PEI-magnetic beads concentration.

Mus dunni cells were infected with serial log dilution of RCR standard in Ψ CRIP-LEGFP1 retroviral vector sample. Cell culture supernatant were harvested on day5 and 10, and RCR were concentrated by PEI-magnetic beads. Viral genome RNA were extracted from beads fraction (day5, 10), untreated culture supernatant (day 5), and RCR solution (day 0), and amount of RCR of each sample was determined by real-time quantitative RT-PCR. Data were the mean \pm S.D. of (n=5)

Table1 Quantitative analysis of RCR concentration by PEI-magnetic beads

RCR Dilution	RCR Quantity (ffu/sample)				
	RCR 0.1ml Untreated	RCR 1ml		RCR 10ml	
		Beads fraction	Beads-treated sup (0.1ml)	Beads fraction	Beads-treated sup (0.1ml)
10 ⁻¹	2.0 x 10 ⁶	4.0 x 10 ⁶	4.9 x 10 ¹	6.3 x 10 ⁶	6.3 x 10 ⁷
10 ⁻²	9.6 x 10 ⁴	1.4 x 10 ⁶	-	3.8 x 10 ⁶	4.4 x 10 ³
10 ⁻³	3.7 x 10 ³	3.4 x 10 ⁴	-	7.2 x 10 ⁵	1.5 x 10 ⁰
10 ⁻⁴	4.8 x 10 ²	3.3 x 10 ³	-	6.6 x 10 ⁴	-
10 ⁻⁵	2.4 x 10 ¹	1.2 x 10 ²	-	2.6 x 10 ³	-
10 ⁻⁶	2.1 x 10 ⁰	6.9 x 10 ⁰	-	1.2 x 10 ²	-
10 ⁻⁷	- *	3.8 x 10 ⁻¹	-	1.0 x 10 ¹	-
10 ⁻⁸	-	-	-	5.0 x 10 ⁻¹	-
10 ⁻⁹	-	-	-	-	-

Serial dilutions of RCR standard were fractionated with PEI-magnetic beads, and quantity of RCR in each fraction were determined by real-time quantitative RT-PCR.

* : under detection limit

Table 2 Comparison of direct S+L- assay and infectivity RT-PCR with PEI-beads concentration in detecting RCR

RCR Infection (ffu/ml/dish)	PG4(S+L-) assay		Infectivity RT-PCR and PEI-beads concentration				
	Day7		Day3	Day4	Day5	Day6	Day7
100	+	6/6	+ 3/3	+ 3/3	+ 3/3	+ 3/3	+ 3/3
10	±	3/6	+ 3/3	+ 3/3	+ 3/3	+ 3/3	+ 3/3
1	±	1/6	± 1/3	± 1/3	± 1/3	+ 3/3	± 1/2
0.1	-	0/6	- 0/3	- 0/3	+ 3/3	± 2/3	+ 3/3
0.01	-	0/6	- 0/3	- 0/3	- 0/3	- 0/3	- 0/3

Serial dilutions of RCR in medium were evaluated in the direct PG4(S+L-) assay and infection of *Mus dunni* cells combined with PEI-beads concentration and real-time quantitative RT-PCR.

Table3 Comparison of direct S+L- assay and infectivity RT-PCR with PEI-beads concentration in detecting RCR spiked in retrovirus vector

RCR Infection (ffu/ml/dish)	PG4(S+L-) assay		Infectivity RT-PCR and PEI-beads concentration					
	Day7		Day5 Beads fraction		Day5 Culture sup		Day10 Beads fraction	
100	+	5/5	+	5/5	+	5/5	+	5/5
10	±	4/5	+	5/5	+	5/5	+	5/5
3	±	2/5	+	5/5	+	5/5	+	5/5
1	±	1/5	±	2/5	-	0/5	±	3/5
0.3	-	0/5	-	0/5	-	0/5	±	1/5
0.1	-	0/5	-	0/5	-	0/5	-	0/5
0.01	-	0/5	-	0/5	-	0/5	-	0/5

Serial dilutions of RCR in Ψ CRIP-LEGFP1 retrovirus vector sample were evaluated in the direct PG4(S+L-) assay and infection of *Mus dunni* cells combined with PEI-beads concentration and real-time quantitative RT-PCR.

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）
分担研究報告書

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
— 欧州におけるバイオ医薬品の同等性／同質性評価 —

分担研究者 川西 徹 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部第3室長

要旨

欧州では、近年米国と同様に製造方法が変更された場合のバイオテクノロジー医薬品の同等性／同質性評価の議論がなされてきた。製造方法が変更されたモノクローナル抗体製剤の同等性／同質性評価における科学的立場からのコンセンサス（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（1995年7月施行））をもとに、最近バイオテクノロジー医薬品の同等性／同質性に関するガイダンスノートが公表され、2002年3月に施行された。FDAのガイダンスと科学的立場は共通しているものの、臨床試験を繰り返さずに同等性／同質性を明らかにする手続きに重きをおくFDAガイダンスと異なり、同等性／同質性評価の科学的方策を総合的にまとめる方向にあり、(1)物理的・化学的特性試験や生物学的特性試験等で差異が出た場合に必要とされる臨床試験との関係、および(2)既に市販されている製品と同様であるとして後発メーカーから申請された製品（いわゆる Generic Biologicals）の同等性／同質性試験の内容、の2点で曖昧な内容となっている。EU内ではこの問題についての議論が継続して行われているようであり、その経過については、我が国における同等性／同質性の評価法を確立する上で注目してゆくべきと考える。

A. 研究目的

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、たんぱく質化学、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、製造方法の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、安全性を保障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、上記の視点から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、この分野の国際動向を調査し、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、調査を行なった。今年度は欧州についてどのような取り組みが行われているかまとめるとともに、米国および我が国との関係を考察した。

B. 研究方法

バイオテクノロジー医薬品の製造方法の変更が医薬品の品質に及ぼす影響の評価に関連する公表論文、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る米国、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、さらに ICH 文書の関連部分等を参考に、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調査した。

C. 研究結果および考察

1. 欧州における Comparability の議論の経過

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および/または精製工程でのスケールアップの間に、立体構造、生産量および/または不純物の質的、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具体的な評価の考え方については触れていない。

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、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おり、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をあげている。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ーといった、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っていることである。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。

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、治療目的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、治療目的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)」の中で提案された内容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/同質性評価にいうて、具体的にどのような試験を行うべきかについて、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) インビゴ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法が確立しており、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分析法である。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長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、有用なる補助的な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ゆくべきである。

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。スペクトル状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。ミ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、および動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トロ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、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、極めて敏感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) さらに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という決定は、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とするなら、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）、およびわ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 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 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。

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

以上のような経過の中、CPMP では製造方法が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 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この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) 原薬および／または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(原薬および／または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((原薬および／または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であろう。したがって、申請者が実際にこのガイダンスノートを承認時に参照しても、この区別は役立たない恐れがある。

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ものの、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「前臨床および／または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をも含めた)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、別のものと考えすることは合理性に欠ける。

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。

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ように思われる。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めざしているようである。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様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、CPMP 内部では、先のガイダンスノートを補う意味で、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。

4. 結論

米国 FDA と欧州 CPMP の、同等性／同質性評価の科学的アプローチには大きな差異はない。即ち、(1)製造方法の変更の前後の製品間についての、物理的・化学的特性(不純物を含めた)および生物学的特性の比較、(2)新しい工程の工程内管理試験、および変更したプロセスの検証、(3)動物モデルを用いた体内動態等の試験(米国では(1)、(2)によって同等性／同質性が確保されたら(3)は必ずしも必要とされないのに対し、欧州では(3)も行うという違いはある)、(4)以上の試験で同等性／同質性が証明されない場合はなんらかの臨床試験、というステップバイステップ、ケースバイケースの評価法である。ただし、米国 FDA は(4)を行わずして同質性／同等性の示すための方策を明確にすることをガイダンス作成の目的としているのに対し、欧州は科学的立場から評価法をまとめることを目的としているようにみえる。科学的にみると(4)のステップの必要性の判断が最も難しく、CPMP のガイダンスノートは製造方法の変更を申請する企業にとって、恐らく最も重要である臨床試験の必要の有無に関する決定方法が曖昧にされている。また工程内管理試験を同等性／同質性の品質クライテリアとして重視している点は、我が国の審査システムからするとそのまま採用することには困難が伴う。CPMP のガイダンスノートは、既に市販されている製品と同等であるとして後発メーカーが後発品を申請する場合(いわゆる Generic Biologicals)の同等性／同質性評価も対象にしているが、必要とされる臨床試験の程度は明確にされていないので、ガイダンスとしては不十分なものとなっている。これらの問題点については引き続き検討が行われているようであり、今後その議論の成果は、我が国の同等性／同質性評価法にも

反映させるべき、注視すべきものと思われる。

E. 研究発表

1. 誌上発表

- (1) 早川堯夫, 真弓忠範, 黒澤 努, 豊島 聰,
山口照英, 川西 徹 トランスジェニック動物由来医薬品の品質・安全性確保に関する基礎的検討 医薬品研究 32, 223-246 (2001)

- (2) 早川堯夫, 豊島 聰, 山口照英, 川西 徹
トランスジェニック動物/クローン動物を利用して製造した医薬品の品質・安全性評価 衛研報告 119, 1-26 (2001)

- (3) 早川堯夫, 谷本 剛, 山口照英, 川西 徹,
酒井喜代志: 医薬品各条の改正点 生物薬品、
薬局、52, 1609-1615 (2001)