

厚生労働科学研究費補助金
医薬品等医療技術リスク評価研究事業

国際的動向を踏まえた
医薬品等の品質・安全性確保に関する研究

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 早川 堯 夫

平成16（2004）年4月

目 次

I. 総括研究報告	
国際的動向を踏まえた医薬品等の品質・安全性確保に関する研究	1
早川 堯夫	
II. 分担研究報告	
1. 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	116
ー バイオ医薬品の同等性/同質性評価法の動向 ー	
川西 徹	
(資料)	
1. Guidance for Industry Comparability Protocols – Protein Drug Products and Biological Products – Chemistry, Manufacturing, and Controls Information	
2. ICH Q5E: Comparability of Biotechnological/Biological Products Subject to Changes in Their Manufacturing Process	
3. ICH Q5E: 生物薬品(バイオテクノロジー応用医薬品/生物起原由来医薬品)の製造工程の変更に伴う同等性/同質性評価	
2. 生物薬品の特性・品質解析, 品質評価法の検討	178
川崎 ナナ	
3. 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	202
新見 伸吾	
4. 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	236
国際動向の研究ー細胞治療薬の新薬治験申請の審査における考慮事項についてー	
山口 照英	
5. 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	258
ーレンチウイルスベクター、レトロウイルスベクターの安全性確保ー	
内田 恵理子	
(資料)	
1. CPMP: Position Statement on Development and Manufacture of Lentiviral Vectors (DRAFT)	
6. わが国におけるマスターファイル制度のあり方に関する考察	278
小嶋 茂雄	
(資料)	
1. 日本の承認審査を実生産で製造方法を視野に入れたものとするための検討	
ICH ホームページの構築:平成11年度厚生科学研究「医薬品等国際ハーモナイゼーション促進研究」(主任研究者:上田慶二東京都多摩老人医療センター名誉病院長)研究報告書 P.18-25 (分担研究者:小嶋茂雄)	
2. 原薬等登録原簿の利用に関する指針(案)について	
(マスターファイル検討会用資料)	
7. 薬局方製剤試験の判定基準の標準化に関する研究	302
青柳 伸男	

8. 製剤開発・製造プロセス開発の妥当性検証に関する国際的動向調査研究-----	309
檜山行雄	
(資料)	
1. "Studies on GMP Quality Assurance supported by Health Sciences Grant H14-Iyaku-04" Y. Hiyama	
2. Summary of Workshop	
3. "Pharmaceutical Affair Law Change and Quality Systems /Regulations in Japan" Y. Hiyama	
4. アストラゼネカ社からの PAT 説明スライドの一部	
5. ファイザー社の PAT 説明スライドの一部	
6. ウォールストリートジャーナルの医薬品製造に関する記事	
7. リスク管理ガイドライン目次案 (2004 年 3 月 19 日版)	
9. 医薬品等の品質・安全性評価-----	352
豊島 聰	
10. 国際的動向を踏まえた日本薬局方の国際化-----	363
武田 寧	
(資料)	
1. Working Procedures of The Pharmacopoeial Discussion Group (PDG) (Revision July 2003)	
2. Pharmacopoeial Discussion Group: Statement of Harmonization Policy (Revision November 2003)	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	378
IV. 研究成果の刊行物・別刷	

国際的動向を踏まえた医薬品等の品質・安全性確保に関する研究

主任研究者 早川 堯夫 国立医薬品食品衛生研究所・副所長

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) 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ための同等性/同質性評価に関する欧米の最新の動向を検討した。米国 FDA の生物製品の同等性/同質性評価プロトコール作成のためのガイダンス案の要点を示すとともに、ICH で専門家間で合意されたバイオ医薬品の同等性/同質性評価ガイドライン案の主な論点と残されている問題点を明らかにした。
- 2) 液体クロマトグラフィー/エレクトロスプレーイオン化・質量分析法 (LC/ESI-MS) を用いた糖鎖プロファイリング法を糖鎖試験法として利用可能か検討した。その結果、安定同位体標識単糖及び糖鎖を内部標準物質として用いることによって、再現性よく、且つ定量的に単糖及び糖鎖を解析できることを明らかにした。
- 3) 抗体医薬品の現状と問題点を検討した。作成法の違いによる各種抗体医薬品の有用性と問題点を明らかにするとともに、抗体医薬品の作用機序、抗体療法の現状と展望および今後の課題についても明らかにした。
- 4) FDA の細胞治療新薬治験申請 (IND) に関するガイドライン案を検討した。本案には細胞治療薬 (細胞組織加工医薬品) の新薬治験申請に当たって、治験開始あるいは治験最終段階までに整備されるべきデータや規格試験法の設定などが含まれており、日本における細胞治療薬 (細胞組織加工医薬品) の IND 審査のあり方に非常に参考になると考えられる。
- 5) 遺伝子治療用医薬品の品質、安全性確保に関する欧米の最新の動向を検討した。EU-CPMP のポジションステートメント案を基にレンチウイルスベクターの品質、安全性確保において考慮すべき点を明らかにした。また、レトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療による重篤な副作用の発生に関して発症機構と安全性確保のための方策を示した。
- 6) 平成 15 年の薬事法改正により導入された原薬等登録原簿 (マスターファイル) 制度について検討した。原薬などの製造業者が、製造方法などに関するノウハウを含む情報を製剤の承認申請者に開示することなく規制当局の審査に提供できるようにするための我が国における制度の運用のあり方を提示した。
- 7) 薬局方製剤試験の国際調和の課題のひとつである含量均一性試験、質量偏差試験について検討した。含量均一性試験の代替として質量偏差試験を適用できる基準及び国際調和案の判定基準の実用性を統計的観点から検討し、質量偏差試験の妥当な適用基準を明らかにした。
- 8) 医薬品製品開発過程において製造工程及び品質規格に品質を織り込むべきであるとする新しい医薬品品質保証のあり方に関する国際的動向を検討した。製剤開発、医薬品品質のリスク管理に関する国際調和ガイドライン作成に関する議論および、医薬品の製品開発、製造工程の近代化を目指す Process Analytical Technology の最近の展開を明らかにした。
- 9) 医薬品承認申請資料の国際的な共通化を目的として ICH により合意され、日、欧で昨年より義務化されたコモンテクニカルドキュメント (CTD) の運用に関する取り組みを検討した。化学薬品原薬の品質分野における欧州の CTD ガイドラインを検討した結果、欧州で申請資料に要求している内容は我が国のものと極端な違いは認められないが、重要工程のとりえ方等に関して差異が示唆された。
- 10) 医薬品品質評価の基準となる日本薬局方の国際化について検討した。薬局方検討会議による薬局方国際調和の最近の動向、調和の現状と課題を明らかにするとともに、薬局方国際調和の結果を反映した日本薬局方の国際化の推進に必要な事項を明らかにした。

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
川西 徹	国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部長
山口 照英	国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部長
青柳伸男	国立医薬品食品衛生研究所 薬品部 第1室長
檜山 行雄	国立医薬品食品衛生研究所 薬品部 第3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
新見 伸吾	国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 第2室長
内田恵理子	国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部 第1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
武田 寧	日本公定書協会 専務理事

協力研究者

橋井 則貴	国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部
香取典子	国立医薬品食品衛生研究所 薬品部 主任研究官

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等の先端技術をより高度に応用した医薬品の開発や従来製品の製造方法の技術革新など、新たな展開が我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するとともに、外国の技術水準に留意した科学的に妥当性のある品質・安全性確保規準や製造管理技術・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) 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—バイオ医薬品の同等性/同質性評価法の動向—
- 2) 生物薬品の特性・品質解析、品質評価法に関する研究

る研究

- 3) 抗体医薬品の現状と問題点
- 4) 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—細胞治療薬の新薬治験申請の審査における考慮事項について
- 5) 遺伝子治療用医薬品の品質・安全性確保に関する研究—レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクターの安全性確保—
- 6) わが国におけるマスターファイル制度のあり方に関する考察
- 7) 薬局方製剤試験の判定基準の標準化に関する研究
- 8) 製剤開発・製造プロセス開発の妥当性検証に関する国際的動向
- 9) 医薬品等の品質・安全性評価
- 10) 国際的動向を踏まえた日本薬局方の国際化

B. 研究方法

B. 1 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—バイオ医薬品の同等性/同質性評価法の動向—

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、EU CPMP、米国製薬工業協会 (PhRMA) の関連文書、インターネット検索によって得られる欧米の関連情報、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。

B. 2 生物薬品の特性・品質解析、品質評価法の検討

1) 試料

ピリジルアミノ(PA)単糖及び PA 化用試薬はタカラ社より購入した。標準単糖は生化学工業製を用いた。尿由来ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(uhCG)及び遺伝子組換え型ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(rhCG)はシグマ社より購入した。N-グリコシダーゼ F (PNGase F) は Roche Diagnostic GmbH 社製を用いた。6 重水素置換 2-アミノピリジン(d_6 -AP)は和光純薬より購入した。

2) 標準単糖の PA 化

カップリング試薬及び還元試薬は以下の溶液を使用した。

・カップリング試薬:40%メタノールを含む 6.7M AP—酢酸溶液

・還元試薬：1.0M ボランジメチルアミン複合体-酢酸溶液

10 μ l のカップリング試薬を凍結乾燥した単糖に加えて 90 $^{\circ}$ C で 20 分間反応させた。溶媒を 60 $^{\circ}$ C で 20 分間、窒素気流下減圧除去後、10 μ l の還元試薬を残渣に加えて 90 $^{\circ}$ C で 35 分間還元した。過剰の未反応試薬は残渣にメタノール(20 μ l)及びトルエン(40 μ l)を加えた後、窒素気流下減圧除去した (50 $^{\circ}$ C、10 分間、2 回)。さらに 50 μ l のトルエンを残渣に加えた後、窒素気流下減圧乾固した (50 $^{\circ}$ C、10 分間、1 回)。アミノ糖はメタノール/ピリジン/水 (30/15/10) 50 μ l に溶かし、2 μ l の無水酢酸を加えて室温で 30 分間反応させ *N*-アセチル化し、反応試薬を SpeedVac で除去後、同様に PA 化した。また 4 重水素置換 PA 単糖 (d4PA) は d6AP を用いて同様に反応させて調製した。

3) 糖鎖加水分解及び PA 化

糖タンパク質 (25 pmol) 及び標準単糖を 2M TFA-2MHCl (20 μ l) で 100 $^{\circ}$ C、6 時間加水分解した。反応液は窒素気流下減圧除去した後、前述と同様に *N*-アセチル化した。得られた単糖は d₆-AP を用いて d₆-PA 化し、標準単糖は d₆-AP を用いて d₄-PA 化して内部標準とした。

4) 糖鎖の切り出し

uhCG 及び rhCG (100 μ g) を 8M グアニジン塩酸塩、5mM EDTA を含む 0.5 M Tris-HCl、pH 8.6 (360 μ l) に溶解し、2-メルカプトエタノール 2.6 μ l を加え、室温で 2 時間反応させた。モノヨード酢酸ナトリウム 7.56 mg を試料溶解溶液 60 μ l に溶かして試料溶液に加え、遮光下、室温で 2 時間反応させた。PD-10 カラム (Amersham Biosciences 社) を用いて脱試薬し、得られた試料溶液を凍結乾燥した。還元カルボキシメチル化 uCG を 100 μ l のリン酸緩衝液 (pH 6.4) に溶解し、2 単位の PNGaseF と 37 $^{\circ}$ C で 48 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沈殿させ、上清を SpeedVac で減圧乾固した。

5) 糖鎖の PA 化

カップリング試薬及び還元試薬は以下の溶液を使用した。

・カップリング試薬：12.8M AP-酢酸溶液

・還元試薬：3.3M ボランジメチルアミン複合体-酢酸溶液

10 μ l のカップリング試薬を還元カルボキシメチル化した uhCG 及び rhCG (100 μ g)由来糖鎖に加えて 90 $^{\circ}$ C で 60 分間反応させた。反応液に 10 μ l の還元試薬を加えて 80 $^{\circ}$ C で 60 分加熱して還元した。反応液にトリエチルアミン-メタノール(20 μ l)及びトルエン(40 μ l)を加えた後、窒素気流下減圧乾固した (60 $^{\circ}$ C、10 分間、1 回)。過剰の未反応試薬は残渣にメタノール(20 μ l)及びトルエン(40 μ l)を加えた後、

窒素気流下減圧除去し (60 $^{\circ}$ C、10 分間、2 回)、さらに 50 μ l のトルエンを残渣に加えた後、窒素気流下減圧乾固した (50 $^{\circ}$ C、10 分間、1 回)。d₄-PA 糖鎖は d₆-AP を用いて同様に反応させて調製した。

6) 単糖組成分析

①HPLC:

装置：Magic2002 (Michrom BioResource 社製)

カラム：Hypercarb (Michrom BioResource 社製、0.2 \times 150 mm)

溶離液 A：2%アセトニトリルを含む 5 mM 酢酸アンモニウム水溶液 (pH 8.5)

溶離液 B：80%アセトニトリルを含む 5 mM 酢酸アンモニウム水溶液 (pH 8.5)

グラジエントプログラム：B 液 10~45% (0~60 分)

流速：100 μ l/分

②ESI-MS:

装置：ESI-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：ポジティブイオンモード (ESI 電圧：2.0kV)

キャピラリー温度：175 $^{\circ}$ C

マルチプライヤー：1200 V

SIM 測定：*m/z* 243、247、259、263、300、304

スキャン速度：0.5 秒/1 スキャン

7) 糖鎖プロファイリング

①HPLC:

装置：Magic2002 (Michrom BioResource 社製)

カラム：Hypercarb (Michrom BioResource 社製、0.2 \times 150 mm)

溶離液 A：2%アセトニトリルを含む 5 mM 酢酸アンモニウム水溶液 (pH 9.6)

溶離液 B：80%アセトニトリルを含む 5 mM 酢酸アンモニウム水溶液 (pH 9.6)

グラジエントプログラム：B 液 5~20% (0~20 分)、20~70% (20~35 分)、70~95% (35~40 分)

流速：100 μ l/分

②ESI-MS:

装置：ESI-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：ポジティブイオンモード (ESI 電圧：2.0kV)

：ネガティブイオンモード (ESI 電圧：1.5kV)

キャピラリー温度：175 $^{\circ}$ C

マルチプライヤー：1000 V

スキャン範囲：*m/z* 700-2200

スキャン速度：3 秒/1 スキャン

B. 3 抗体医薬品の現状と問題点

ヒト型抗体医薬品の作成法、各ヒト型抗体医薬品の長所と短所、作用機序ならびに現在認可されている抗体医薬品それぞれの特徴について、参考文献1~45を中心に検討した。

B. 4 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 — 細胞治療薬の新薬治験申請の審査における考慮事項について

昨年FDAより審査官むけの細胞治療INDガイドライン案として発出された「細胞治療薬の新薬治験申請の審査方針及び審査報告書フォーマット」を中心に検討を行った。また、関連する各種基準やガイドラインについても調査研究し、我が国やEUとの規制の違いや、共通する重要事項などを検討した。

B. 5 遺伝子治療用医薬品の品質・安全性確保に関する研究—レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクターの安全性確保

EU CPMPが2003年に作成したレンチウイルスベクターの開発と製造に関するポジションステートメント案(内田資料1; Position statement on development and manufacture of lentiviral vectors)及び関連する論文等を基にレンチウイルスベクターの品質、安全性確保に重要な要件を検討した。また、フランスでのX連鎖重症複合免疫不全症(X-SCID)に対するレトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療による白血病発症事例に関連する論文、報告書等を基に、遺伝子治療の副作用としての白血病発症の機構と安全性確保のための方策について検討した。

B. 6 わが国におけるマスターファイル制度のあり方に関する考察

平成11年度に行われた欧米のドラッグマスターファイル(DMF)制度に関する厚生科学研究の成果(小嶋資料1)、ならびにこれまでに4回開催されたマスターファイル検討会における議論を踏まえて、わが国におけるマスターファイル制度のあり方に関して考察を加えた。

B. 7 薬局方製剤試験の判定基準の標準化に関する研究

1) 質量偏差試験の適用基準

含量均一性試験の代替として質量偏差試験を適用できる基準を統計的に明らかにすべく、平均含量、主薬濃度のばらつきを代えた場合の含量均一性および質量偏差試験のOC曲線をモンテカルロシミュレーションにより作成した。それを基に、質量偏差試験の適切な適用基準について検討した。

2) 市販製剤の主薬濃度の変動及び判定基準への適合性

市販の錠剤、カプセルについて含量均一性及び質量偏差試験を行い、主薬濃度のばらつきを検討した。

B. 8 製剤開発・製造プロセス開発の妥当性検証に関する国際動向

医薬品の品質関連国際専門家会議での議論を基に新しい品質保証の国際的な議論を概括した。また、製品開発及び製造工程の近代化をめざすProcess Analytical Technology(PAT)について、FDAのPATガイド案や国際製薬企業におけるPATの実践を基に最近の動向を検討した。

B. 9 医薬品等の品質・安全性評価

化学薬品に関してCTDガイドライン(http://www.ich.org/MediaServer.jserv?@_ID=556&@_MODE=GLB)、EUガイドライン“GUIDELINE ON THE CHEMISTRY OF NEW ACTIVE SUBSTANCE”(<http://www.emea.eu.int/pdfs/human/qwp/013096en.pdf>)並びに平成13年度に事務連絡されたQ&Aおよび平成14年度に事務連絡された第二部概要のモックアップを比較し、欧州における化学薬品原薬の品質保証の考え方を調査検討した。

B. 10 国際的動向を踏まえた日本薬局方の国際化

薬局方検討会議(Pharmacopoeial Discussion Group, PDG)における薬局方国際調和の最近の動向及び日本薬局方のPDGへの対応を調査、検討した。

C. 研究結果及び考察

C. 1 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—バイオ医薬品の同等性/同質性評価法の動向—

バイオ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、タンパク質化学、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、製造方法を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。しかし製造方法の変更を行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、好ましい製造方法の変更を妨げる要因にもなりうる。そこで現在、これら医薬品の製法変更時の評価法について検討が求められている。

バイオ医薬品のほとんどは有効成分である目的物質において本質的に分子多様性 heterogeneity があり、同一性の定義は難しい。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時の評価法を定めるための基礎資料を提供するために行った。今年度は、米国におけるコンパラビリティプロトコール(同等性・同質性プロトコール) 関連の動き、および国際調和ガイドラインについて報告する。

C.1.1 米国における同等性・同質性評価の議論の経過

米国 FDA はバイオ医薬品の製造方法の変更に伴う同等性/同質性評価について今まで2つのガイダンスドキュメントを公表している。一つめは1996年4月に公表された「FDA Guidance Concerning Demonstration of Comparability of Human Biologic Products, Including Therapeutic Biotechnology-derived Products (治療用バイオテクノロジー応用医薬品を含む生物医薬品の同等性/同質性を提示するためのFDAガイダンス)」であり、この文書で「製造方法の変更が行な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/同質性評価試験データが示すのなら、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」という米国におけるバイオテクノロジー応用医薬品の製造方法の変更に関する同等性/同質性評価の基本的考えを明らかにした。この文書でFDAは同等性/同質性評価の概念を提示するとともに、製造業者は同等性/同質性評価試験の計画にあたって、事前にFDAと十分に協議し、FDAとの合意の元に同等性/同質性評価プロトコールを定めた後、実際の試験を行うよう求めた。

2つめのガイダンスは1997年7月に公表された(Guidance for Industry: Change to an Approved Application for Specific Biotechnology and Specified Synthetic Biological Products; 製薬業界へのガイダンス: バイオテクノロジー医薬品および合成生物製品の既承認内容の変更について)。これは先のガイドラインで概念が提示された同等性/同質性評価プロトコールの内容、および製造方法の

変更についてのFDAへの報告のルールの手引きとして作成されたものである。

C.1.2 米国における生物製品の製法変更時のシステムとしての同等性・同質性評価プロトコールの定着

C.1.2.1 同等性・同質性評価プロトコールの作成に関するマニュアルとしてのガイダンス案

最近(2003年9月)になって、生物製品の製法変更時の同等性・同質性評価法に関係する第三のガイドラインのドラフトが公表され、現在その意見聴取期間にある。テーマは「製薬業者に向けたガイダンスー同等性・同質性評価プロトコールータンパク質製品および生物製品ー化学、製造、管理情報」(Guidance for Industry Comparability Protocols – Protein Drug Products and Biological Products – Chemistry, Manufacturing, and Controls Information: 川西資料1)である。このガイダンスは、米国において約6年間実施された同等性・同質性評価プロトコールの制度について、その経験を踏まえて、FDAが申請者たる製薬業者に向けて用意した“同等性・同質性評価プロトコール作成のための手引き”である。その内容は以下の通りである。

製造業者に向けたガイダンス

同等性・同質性プロトコール ——タンパク質製品および生物製品—— CMC 情報

I. 緒言

本ガイドラインは申請者が製品の CMC (Chemistry, Manufacturing, and Controls) 上の変更を行う際の同等性・同質性評価プロトコールの作成、使用にあたって推奨される要件を明らかにするためのものである。同等性・同質性評価プロトコールは、指定された種類の製法変更が、安全性あるいは有効性の観点から製品の同一性、有効成分量(純度)、品質、純度あるいは力価に有害影響を及ぼさないことを示すために実施される試験、バリデーション方法及びその判定基準を含む包括的計画書である。このプロトコールの使用によって有害影響の潜在的危険性は減少する。FDAによる同等性・同質性評価プロトコールの査読には、プロトコール使用による製法変更の報告カテゴリーの引き下げを認証するかどうかの決定も含まれる。

本ガイダンスは、治療用組換え DNA 応用タンパク質製品、天然由来タンパク質製品、血漿由来タンパク質製品、ワクチン、アレルゲン、治療用 DNA プラスミドなどのバイオリジクスライセンスの申請(BLA)、あるいはBLAへの補足文書として提

出される同等性・同質性評価プロトコールに適用される。

本ガイダンスは、輸血用および血液製剤製造用ヒト血液および血液成分、体細胞を用いた細胞治療用医薬品、遺伝子治療用ベクター（治療用 DNA プラスミドを除く）に関する同等性・同質性評価プロトコールは対象としない。本ガイドラインは合衆国農務省によって規制をうける動物用ワクチンを対象としたものでもない。

本ガイダンスを含め、FDA のガイダンスは法的に強制される責任を明確にするものではなく、当該テーマに関する当局の見解を述べるものである。特に規制や法律にかかわる要求が引用されない限り勧告として扱うこと。ガイダンス内容は、示唆あるいは推奨であって、要求ではない。

II. 背景

承認後における CMC 上の変更による製品の同一性、有効成分量（純度）、品質、純度、力価への影響については、製造業者は製品の出荷に先立って、安全性あるいは有効性の観点から評価する責任がある。そのような評価には、しばしば変更前後の製品（すなわち、変更前先立って製造された製品と変更後に製造された製品）が同等・同質であることを示すデータを含む。承認後における CMC 上の変更については、連邦食品医薬品化粧品法（21 USC 356a）の中で FDA によって定められた報告カテゴリーに従って、FDA に報告しなければならない

（II.E 節を参照）。変更の影響を評価するための同等性・同質性評価プロトコールの査読およびその承認行為の一部として、FDA は同等性・同質性評価プロトコールのもとでなされた CMC 上の変更に関する報告カテゴリーを一段階引き下げてよいと決定するであろう。多くの場合、同等性・同質性評価プロトコールを使用すれば、CMC 上の変更の実行およびその報告が促進され、プロトコールが提出されない場合に比べて、製品の出荷を早めることができるであろう。

・年次報告（AR）

既承認の申請について、製品の安全性あるいは有効性の観点から、製品の同一性、有効成分量（純度）、品質、純度、あるいは力価に有害な影響を示す可能性が小さい変更は、年次報告によって報告する。

・変更と同時に発効する補足文書（CBE）

既承認の申請について、製品の安全性あるいは有効性の観点から、製品の同一性、有効成分量（純度）、品質、純度、あるいは力価に有害な影響を示す可能性が中程度の変更の報告は、この形式により提出する。CBE による補足文書は、変更後の製品の出荷前、あるいは出荷と同時に FDA によって受理され

る。FDA は変更に関する今までの経験により、当該変更に関する補足文書が通常は完全に適切な情報を含んでいると判断できるので、この補足文書は 30 日告知による補足文書とは区別可能である。さらに提案された変更は正しく申告されていることを認め、変更された製法によって製造された製品は FDA が補足文書を受理すると同時に出荷してもよい。

・30 日告知による製法変更の申告の補足文書（CBE-30）

既承認の申請について、製品の安全性あるいは有効性の観点から、製品の同一性、有効成分量（純度）、品質、純度、あるいは力価に有害な影響を示す可能性が中程度にあるような変更の報告は、この形式により提出する。CBE-30 の補足文書は変更された製品を出荷する少なくとも 30 日前に FDA に受理されていなければならない（21 CFR 601.12(c)(3)）。

・事前承認の補足文書（PAS）

既承認の申請について、製品の安全性あるいは有効性の観点から、製品の同一性、有効成分量（純度）、品質、純度、あるいは力価に有害な影響を示す可能性が実際にあるような変更の報告は、この形式により提出する。FDA は変更された製品を出荷する前に PAS を受け取り、承認する（21 CFR 601.12(b)）。

本ガイダンスは同等性・同質性評価プロトコールを作成し提出する際の一般原則と実施要領について記すものである。また、本ガイダンスは同等性・同質性評価プロトコールの基本的要素および以下のような変更の際に同等性・同質性評価プロトコールを作成する際に考慮すべきポイントについて記したものである。

- ・ 製造工程
- ・ 分析方法
- ・ 製造装置
- ・ 製造施設
- ・ 容器包装
- ・ 工程の分析方法（PAT）

本ガイダンスはマスターファイル中に同等性・同質性評価プロトコールを提出することについても触れている。

A. 同等性・同質性評価プロトコールとは？

同等性・同質性評価プロトコールは、CMC 上の変更が、安全性および有効性への観点から当該最終製剤の同一性、有効成分量（純度）、品質、純度、力価にどのような影響を与えるか評価するために適切に定義し、詳細にわたって記述した計画書である。同等性・同質性評価プロトコールは、そのプロトコールが扱う製法変更について記し、実施すべき試験、および CMC 上の変更が製品に悪影響を与え

ないことを示すために満たすべき判定基準を含むものである。CMC 上の変更にあたって、同等性・同質性評価プロトコルの提出が求められるというものではない。

B. 同等性・同質性評価プロトコルを使用するとどのような利益があるのか？

FDA は同等性・同質性評価プロトコルを承認すると同時に、適切な場合には承認された同等性・同質性評価プロトコルによってカバーされる CMC 上の変更の報告カテゴリーの段階を引き下げること認めるであろう。また、同等性・同質性評価プロトコルにおいて詳細に計画されるので、プロトコルのもとで行われる製法変更を支持するための追加情報を要求することはないであろう（例外については IVD 節を参照のこと）。同等性・同質性評価プロトコルの使用によって申請者は CMC 上の変更の実施が可能となり、さらに同等性・同質性評価プロトコルを使わない場合に比べて、迅速に製品の出荷を行うことが可能となる。

C. 同等性・同質性評価プロトコルの作成時期と理由

長年にわたって、有効期間の延長やプラスチック容器の互換のような CMC 上の変更を実施するためにプロトコルの使用経験を積んできた。さらに最近、製品の特性解析手法、製造工程、製造管理、出荷試験の技術において改善がなされてきた。これらの改善、さらに CMC 上の変更の製品への潜在的な影響評価の改善を理由として、プロトコル類は現在、その他の種類の CMC 上の変更（例えば、製造工程、分析方法の変更）にも用いられるようになってきた。このため、FDA による規制の中で、同等性・同質性評価プロトコルの使用が拡大してきており、その他の変更においても同等性・同質性評価プロトコルの使用に関心を示す申請者から、ガイダンス作成を求める意見が数多く寄せられている。CMC 上より多種類の変更についても、同等性・同質性評価プロトコルを使用することによって、申請者は変更をより迅速に実施できるようになっている。

D. 同等性・同質性評価プロトコルに関するガイダンスが作成される理由は？

CMC の変更のための同等性・同質性評価プロトコルの使用に興味を示す申請者から、ガイダンスを求める声が多く寄せられた。特定の製品およびタンパク質性製剤を含む生物薬品に関する様々な CMC 上の変更のための同等性・同質性評価プロトコル査読の経験を、このガイダンスに込めている。

E. 承認後の変更および同等性・同質性評価に関する情報はどこにあるのか？

本ガイダンスはその他の FDA ガイダンス文書を

超えるものとして意図しているわけではなく、むしろ承認後の製法変更を実施するために同等性・同質性評価プロトコルを使用する上での情報を補うためのものである。承認後の製法変更に関連する情報に関しては、関連ガイダンスを参考にしよう推奨する。以下のガイダンスには次のような関連情報が記載されている：（1）CMC の変更が製品の特性に及ぼす影響の評価、（2）承認後の変更を支持する文書の作成、（3）推奨される報告カテゴリー

- ・ 治療用バイオテクノロジー応用医薬品を含む生物薬品の同等性・同質性の提示に関する FDA ガイダンス（1996 年 4 月）
- ・ 製薬業者にむけたガイダンス：バイオテクノロジー応用医薬品および合成生物薬品の既承認の申請内容の変更（1997 年 7 月）
- ・ 製薬業者にむけたガイダンス：生物製剤の既承認の申請内容の変更（1997 年 7 月）
- ・ 製薬業者にむけたガイダンス：既承認の NDA あるいは ANDA の化学、製造および管理の変更（1997 年 11 月）
- ・ 製薬業者に向けたガイダンス：既承認の NDA あるいは ANDA の化学、製造および管理の変更（ドラフト）（1999 年 6 月）

III. 同等性・同質性評価プロトコルを計画する際に考慮すること

A. 同等性・同質性評価プロトコルはどのように CMC 上の変更の報告に影響するか？

同等性・同質性評価プロトコル中では計画した CMC 上の変更、実施する試験研究、用いる分析方法、および CMC 上の変更の影響を評価する際の基準となる判定基準が指定される。適切に計画されたプロトコルによって、変更の製品への有害影響の可能性を評価する上で、十分な情報が提供される。FDA は同等性・同質性評価プロトコルを査読する際、当該変更は、同等性・同質性評価プロトコルを用いることで、プロトコルなしで変更が実施された場合の報告レベルを引き下げることが可能であるか決定する。典型的な例としては、承認された同等性・同質性評価プロトコル下での変更の報告カテゴリーは、通常の変更より一段階下の報告カテゴリーとなる（例えば、PAS は CBE-30、CBE は AR となる）。場合によっては、一段階以上、段階が下がることもある（例えば PAS が AR へ）。

B. 同等性・同質性評価プロトコルが CMC の変更には有益なのはいつ？

同等性・同質性評価プロトコルは様々な CMC 上の変更にも有用となりうる。しかしいくつかの例外はある（III.C 節参照）。加えて、同等性・同質性評価プロトコルは CMC 上の単一の変更あるいは複数の変更に関して扱うこともでき、繰り返し行う変更特に有用である。生体由来物質やタンパク質性医薬品は複雑で不均一であり、製品の特性がどのよ

うに安全性や品質に影響を及ぼすかについての情報が、同等性・同質性評価プロトコルをデザインする上で重要である。また、製品への変更の影響を評価するために、あらかじめ試験、検査、分析法、および判定基準を特定するのに十分な製造および分析経験を持つことが重要である。開発探索研究、製造経験、工程の能力、規格外の研究、特定の製品についての安定性データ、さらに場合によっては同じ製品や同じ工程に関する製造情報（例えばモノクローナル抗体）にはしばしば有用な情報が含まれる。しかし、CMCの変更によっては、製造経験への依存は低いので、情報としては有用でない場合もあるだろう（例えば包装の変更）。導入する予定のCMC上の変更についてのみ、プロトコルを提出することを推奨する。

同等性・同質性評価プロトコルを作成するかどうか決定する際には、製品特異的な特性および製法特異的な特性を考慮することを推奨する。特性には以下を含むが、それに限るものではない。

- 製品の構造の複雑性
- 製品の物理化学的、生化学的、免疫学的微生物学的、生物学的特性を評価する能力
- 検出可能な製品特性（例えば製品の構造および物理的性質）のの違いの程度
- 製品の不均一性の程度
- 可能性のある不純物の変化が製品の安全性に与える影響
- 製品の頑健性（即ち、製品が製法変更によって影響を受けない可能性）
- 製造工程の管理のあいまいさ（即ち、製品が変更によって影響を受けないことを保証するための製造管理能力）

以下のことが予測される場合のみ、同等性・同質性評価プロトコルの使用を考慮することを推奨する：(a)変更の結果、原薬あるいは製剤の規格および非日常的な特性解析の判定基準にあう、(b) 認可された製品において変更の影響を評価するために適切かつ感度の良い分析法が確立/検証され、あるいは最適化されている（即ち非日常的な特性解析研究など）、(c)承認された製造工程および製造設備が十分に調整され、検証されている。

以下は同等性・同質性評価プロトコルを用いた製法変更の例である：

- 設備の大きさに影響するバッチサイズの増加あるいは減少
- 培養における生産操作パラメータの変更（例えば、時間、温度、pH、酸素濃度（溶存酸素））
- 原材料の追加、削除あるいは変更（例えば緩衝液あるいは溶液成分）
- 方法の変更（普通は濾過から遠心のような設備の変更を伴う）

- 手順の変更による新しいワーキングセルバンクの確立
- 原薬あるいは最終製剤の再加工
- 生産ステップの追加、削除、再構成
- BLA、あるいはBLAへの補足文書中に作成された施設/事業所情報の伴った製品に関する施設関連の変更プロトコル

C. 同等性・同質性評価プロトコルが不適切な場合は？

CMC上の変更によっては同等性・同質性評価プロトコルは不適切である。場合によっては、CMC上の変更の製品への影響を評価するために、変更や計画についてあらかじめ十分に述べることは不可能かもしれない。例えば有効性、安全性（臨床あるいは非臨床）、あるいはファーマコカインेटィック/ファイマコダイナミック（PK/PD）に関する情報なしに製品への影響を評価するには複雑すぎる製法変更もあるかもしれない。

一般的に以下に関する同等性・同質性評価プロトコルは推奨しない

- CMC上の変更に関する、非特定の計画
- 製品への有害な影響を事前に設定した試験、研究、分析方法、および判定基準では評価しえないようなCMC上の変更
- 研究中の新薬（IND）、研究中の新動物薬（INAD）、あるいは新適用の申請を保証するようなCMC上の変更
- 変更の影響を評価するために有効性、安全性（臨床あるいは非臨床）、あるいはPK/PDデータ（例えば、剤型の変化、新しい不純物の評価のための臨床あるいは非臨床試験、不純物の評価、あるいは免疫原性/抗原性の評価）を必要とするようなCMC上の変更

上記のようなCMC上の変更でも同等性・同質性評価プロトコルをデザインすることは可能であるかもしれないが、そのようなプロトコルのもとで実施された製法変更に関して、PAS以外の報告カテゴリーを事前に指定することはできない。それ以上にその種の製法変更はIND、INAD、あるいは新しい承認申請が必要になると考えられる。そのような変更例には以下のものがある：

- 原薬あるいは製剤の規格の変更（例外はV.A.4とV.Cを参照）
- 製剤の剤形の定性的、定量的変更
- 送達システムの変更
- 査察（例えばcGMP査察）に対応するための製造場所、製造施設、製造領域の変更（例えばII.D節に挙げられたガイダンスに例示されている）
- BLAあるいはBLAへの承認後の補足文書とし

て申請された施設／事業所情報を伴った施設関連の変更

IV. 同等性・同質性評価プロトコルの作成法

A. 同等性・同質性評価プロトコルはどのように提出するか？

同等性・同質性評価プロトコルは既承認の承認申請書の補足文書として、あるいはオリジナルの申請書の一部として提出できる。しかし製造経験が限られており、適切な同等性・同質性評価プロトコルの要素を決定することが困難な場合は、オリジナル申請書の中に同等性・同質性評価プロトコルを含むことの妥当性を評価したほうがよい (III.B 節を参照)。同等性・同質性評価プロトコルを提出していることを示すことを推奨する。

同等性・同質性評価プロトコルは以下のような形で提出できる：

- ・ 同等性・同質性評価プロトコルのみを含む事前承認のための補足文書として。提出者はFDAに当該プロトコルを査読、承認してもらい、プロトコル中で指定されたデータを作成する前に、プロトコルのもとで評価される変更の報告カテゴリーを決定してもらいたい。
- ・ 同等性・同質性評価プロトコル、研究結果、その他の関連する情報を含む事前承認用補足文書として。提出される同等性・同質性評価データは事前承認のための補足文書の一部として評価されることを認識してほしい。変更された工程によって既に製造された製品は、補足文書の承認後にのみ出荷できる。
- ・ オリジナルの販売承認申請書の一部として。申請者はプロトコル中に指定されたデータを得る前に、査読、承認され、報告カテゴリーを決定して欲しい。

すべてのケースにおいて、プロトコルに指定されたCMC上の変更後に製造された製品の出荷前に同等性・同質性評価プロトコルは承認されていないなければならない。プロトコルに指定されている通り、変更された工程によって製造された製品が出荷される前に、変更が製品の同一性、有効成分量（純度）、品質、純度、力価に及ぼす影響を評価するための研究を行い、プロトコルの一部としてFDAが決定した報告カテゴリーにしたがって報告しなければならない（本法律の506A(b)章、および21CFR 601.12を参照）。

B. 同等性・同質性評価プロトコルの承認後、どのように変更および研究結果を提出するか？

プロトコルが承認された後、FDAが指定した報告カテゴリーにしたがって、プロトコルの適用対象の中で、実施された変更を文書化し、提出する

ことが推奨される。それには以下のものが含まれる：(1) 同等性・同質性評価プロトコルに指定されたすべての試験研究結果、(2) 試験研究に影響した可能性のある試験研究中に生じた重要な変化についてのディスカッション、(3) 環境についての分析、製品への影響、矯正のための行動、結論についてのまとめ、(4) その他関連情報。同等性・同質性評価プロトコルによってカバーされる変更に関するデータが含まれていることを提出書類中に示すこと、同等性・同質性評価プロトコルが承認されたオリジナル申請書の参考文献を作成すること。

C. 承認され同等性・同質性評価プロトコルの中で指定されたクライテリアに研究結果が一致しない場合はどうするか？

承認された同等性・同質性評価プロトコル中に指定された変更、試験、研究において、予期しない、望まない結果がでる場合もありうる（例えば試験結果が事前に定められた判定基準に合わない場合）。その場合、変更を行わないという選択もありうる。それでも変更する場合は、安全性および有効性の観点から、変更が製品の同一性、有効成分量（純度）、品質、純度、力価に悪影響を及ぼさない理由を明らかにする、データを伴った事前承認のための補足文書を提出することを推奨する。

D. 同等性・同質性プロトコルが用いられなくなるのはいつか？

同等性・同質性評価プロトコルが承認された後、新しい規制上の要求、安全性の問題（例えば、生物原料の新しい感染性物質の検査）、新しい科学的問題の発生、あるいは科学水準の進歩によって、プロトコルが不用になることがありうる。既承認申請書、現在の規制要件、科学的水準に同等性・同質性評価プロトコルが適応していることを保証するために、承認されている同等性・同質性評価プロトコルの試験、研究、分析方法、判定基準を申請者が査読しすることを推奨する。当該プロトコルに従って変更を実施申請する前に、同等性・同質性評価プロトコル中で述べられた試験、研究、分析方法、判定基準が適切であるかについて決定することを推奨する。FDAは不用となった同等性・同質性評価プロトコルについては承認時に決定された報告カテゴリー分類がもはや適用できないと決定するかもしれない。時代遅れのプロトコルを用いて評価された変更については、変更を支持する追加情報を求めることもありうる。もし、同等性・同質性評価プロトコルがもはや正しくない、あるいは適切ではないことを発見したら、現在のプロトコルを修正あるいは取り下げるべきである。

E. 承認された同等性・同質性評価プロトコルの修正はどのように行うか？

改訂プロトコールはいつでも提出することができる。オリジナルプロトコールと同様に IV.A 節にまとめられた提出方法に従って、承認申請書への PAS として改訂プロトコールを提出することができる。提出書の中に、既承認同等性・同質性評価プロトコールへの改正点および修正すべてを明記するよう、推奨する。

同等性・同質性評価プロトコールは、申請書の中で関連する変更を反映するように修正すべきである。例えば、出荷試験に用いられる分析方法における変更の承認を FDA に求めるかもしれない。新たな分析方法は、適切ならば同等性・同質性評価プロトコールの中に組み込むべきである。出荷試験における変更を求める場合、提出書類中に、影響を受けるすべての同等性・同質性評価プロトコールを明記するよう推奨する。当該同等性・同質性評価プロトコールは、変更に適した報告カテゴリーを用いて、出荷試験における変更に関する申請書の一部としてアップデートされることになる。それぞれの同等性・同質性評価プロトコールの修正を求めるため、別々の書類を提出する必要はない。しかし、出荷試験における変更の実施が認められるまでは、修正された同等性・同質性評価プロトコールの実施は待たなければならない。

V. 同等性・同質性評価プロトコールの内容

FDA は既存の変更管理規定の延長線上で同等性・同質評価プロトコールを作成、使用するよう推奨する。そのようなやり方によって、工程の変更が製品の同一性、有効成分量（純度）、品質、純度、あるいは力価に悪影響を及ぼさないことが保証される。

同等性・同質性評価プロトコールにおいては、CMC 上の単一の変更、あるいは複数の変更を記すことができる。変更を特定し、変更の影響を評価するための判定基準を定義することを推奨する。複数の変更を一つのプロトコールに含む場合、複数の変更は相互に関連していることを推奨する（即ち、一つの変更は他の変更なしにありえない；製造の最適化のような共通の目標に焦点を絞った変更）。たとえば、タンパク質の製造に用いる細胞培養液の変更は細胞の増殖を早め、ひいてはタンパク質の生産速度を速める。培養液の変更に関連した変更には、醗酵時間の延長、タンパク質生産時間の延長あるいは精製カラムの変更なども含まれる。無関係な変更については別個の同等性・同質性評価プロトコールを提出することを推奨する。

A. 同等性・同質性評価プロトコールの基本要素は何か？

1. 計画した変更の記述

同等性・同質性評価プロトコールには、計画された変更について詳細な記述をするべきであり、承認

申請書において認められた条件との違いをすべて明らかにすべきである。表、図、フローチャートは違いを理解する上で助けとなる。

2. 実施すべき試験研究

原薬、製剤、そして適切な場合は中間体、工程中の物質、あるいは変更によって影響を受ける可能性のある成分（容器包装システム）への変更の影響を評価するために実施する試験（例えば工程）、研究（例えば特性解析、安定性、不純物除去、研究室レベルの有害物質除去あるいは不活化、バリデーション、工程開発）のリストを挙げるよう推奨する。一連の試験法、研究法セットを選択した妥当性についての説明を含むことを推奨する。この説明には変更の種類と程度、変更の潜在的な影響、製造工程に関する経験、製品の頑健性が含まれる。例えば、変更の結果生成する新しい不純物、糖鎖の付加体、あるいは他の翻訳後修飾を調べるための追加試験、あるいは非日常的試験（例えば特性解析）が考えられる。そのような追加試験は、特に工程管理規格、あるいは出荷規格が変更の影響を評価するに十分な場合（例えばタンパク質の二次、三次構造）、特に重要である。プロトコールの中で日常的な出荷試験の結果を比較し、変更前後、あるいは、適切ならばその他の物質について非日常的試験（例えば特性解析）によって比較するような計画を含むことを推奨する。比較する変更前後のロットや試料の数と種類を特定することを推奨する。比較すべき変更前後のロットや試料の数と種類は、提案された変更、製品あるいは工程の種類、利用可能な製造情報によって変わりうる。貯蔵中の物質に有意な違いがないのなら（例えば、時間経過にしたがって分解物の濃度が増加する場合）、比較のために変更前の物質の試料を使うことができる。保存サンプルを使用する予定がある場合、保存最大時間を特定し、保存試料の使用を支持するデータの妥当性を明らかにするよう推奨する。一般に、変更後の物質に関する試験結果は、変更前の物質で観察されたロット間の通常のばらつき内に納まるべきである。

同等性・同質性評価プロトコールにおいては、変更前と変更後の製品の同等性・同質性を示すために行う安定性試験計画を含むことを推奨する。同等性・同質性評価プロトコールは以下を定める：（1）研究すべきロットの数と種類、試験条件、試験実施タイミングのような安定性試験のプロトコールに通常含まれる情報、あるいは（2）現行の承認された安定性試験プロトコール。変更された製法による製品が出荷される前に収集された安定性データの量を特定すべきである。安定性評価の計画は提案された変更の程度、製品の種類、利用可能な製造関連情報によって変わりうる。場合によっては、安定性試験は承認後の安定性試験の結果で十分と判断されることもあるかもしれない。もし安定性試験を行う計画がない場合は、そのことを明確にし、妥当性

を明らかにすること。

既承認の申請、あるいはその後の更新（即ち補足文書、年度報告）で報告されたことと何らかの違いがあれば報告すること。言及された試験あるいは研究については、引用等すべてを含むことを推奨する。

3. 用いられる分析方法

プロトコールにおいて、製品あるいは中間物質への CMC 上の変更の影響を評価するために用いる予定の分析方法を特定するよう推奨する。不純物（即ち宿主由来タンパク質のような工程関連不純物、製品関連不純物、その他）、あるいは変更の製品への影響を検出し定量することが可能な分析方法を採用するよう推奨する。

現在認可されている分析方法は既承認製品および工程に最適化されているので、修正した新しい分析方法を使用したいと思うかもしれない（即ち、新しい製造工程中で生成した新しい工程由来不純物の除去をモニターするため）。この場合、新旧の分析方法を用いて、変更前後の製品に関する結果を提出することを推奨する。計画された変更の可能性を評価するために実施する研究は、しばしば現行の既承認の分析方法が変更後の製品への影響を評価するのに適当であるかを決定する上で助けとなる（VA.5 節参照）。適当であれば、新しいあるいは修正した分析方法を（判定基準とあわせて）バリデーションし、あるいは現在ある分析方法の再バリデーションを行う。代わりに、新しい分析方法のバリデーション、あるいは既存の方法の再バリデーション計画がプロトコールの中に含まれ、指定された報告カテゴリに合わせて FDA にバリデーションレポートが作成されることもありうる。

場合によっては、ある分析方法は特性解析や製品の機能評価に用いられるが、出荷試験あるいは工程管理には用いられないこともある（即ち、NMR スペクトロスコピー、炭水化物構造解析、分岐部位決定）。同等性・同質性評価プロトコールにおける分析方法を特定するのなら、既に承認を受けた申請において提出した方法に置き換わる方法、あるいは修正方法を作成し、CMC 上の変更が実施される時に、承認をうけた同等性・同質性評価プロトコールを用いて行った検討結果を FDA に報告するよう推奨する。

分析方法における変更を、他の CMC 上の変更と関係なく実施する予定の場合は、分析方法の変更にて特化した同等性・同質性評価プロトコールを提出するよう推奨する。

4. 判定基準

CMC 上の変更の製品あるいはその他の物質への影響を評価したり、製法変更前後の製品の同等性・同質性評価を行うために用いられるプロトコールにおいては、それぞれの試験研究のため判定基準（数字の限度値、幅あるいはその他のクライテリ

ア）あるいはその他の許容基準を含むことを推奨する。別途妥当性が示されている場合以外は、一般に原薬および製剤規格は、既承認の申請書における規格と同じか、より厳格であるべきである。実施すべき統計的分析法、および評価基準を明らかにすることを推奨する。

同等性・同質性評価プロトコールの下での製法変更の実施後に、CMC 上の変更によって原薬あるいは製剤規格の修正が必要となることがあるかもしれない。そのような環境下での規格の変更は、同等性・同質性評価プロトコールの提出のためになされる報告カテゴリを決定する際には考えられていないだろう。したがって、CMC 上の変更を申請する際には、同等性・同質性評価プロトコールを使用した変更の報告のために定められた報告カテゴリと同様に、規格変更の種類にあった報告カテゴリを考慮することを推奨する。規格の変更に関する推奨報告カテゴリが、同等性・同質性評価プロトコールのもとでなされた変更の報告カテゴリ（即ち CBE-30）より高い場合（即ち PAS）には、規格の変更に伴う報告カテゴリの使用、即ちより高い報告カテゴリの適用を推奨する。もしも規格変更に関する推奨報告カテゴリが、同等性・同質性評価プロトコール下での変更についての報告カテゴリと同等か低い場合、承認された同等性・同質性プロトコールを使用して実施された CMC 上の変更を報告する時に、規格のアップデート、あるいは追加もありうる。

5. 同等性・同質性評価プロトコール下で報告されるべきデータ

承認された同等性・同質性評価プロトコールを使用して実施した CMC 上の変更を FDA に報告する際に提出し、適切ならば変更をうけた製品を出荷する前（例えば、提案された報告カテゴリが CBE-30、CBE-0 あるいは AR）に提出するデータの種類（例えば出荷、長期、加速や苛酷安定性データ）および量（例えば 3 ヶ月加速、6 ヶ月実時間安定性データ）を明らかにすることを推奨する。

利用可能であれば、提案された同等性・同質性評価プロトコールを伴った変更の実現可能性を評価するために実施される研究からのデータを含むこともできる。スモールスケールプロセスによる研究、あるいは提案された変更を導入するためのその他の研究から得られたデータは、変更の影響についての予備的情報となるとともに、変更が実現可能であることを示す予備的証拠にもなる。開発研究あるいはフィージビリティ研究は製品や工程を評価するために設定した一連の試験の選択の妥当性や適格性をみる上での視点を提供することができる。

6. 報告カテゴリの提案

提案された同等性・同質性評価プロトコールの使用によって、特定の CMC 上の変更を実施する際の

報告カテゴリーの段階が引き下げられることがある (III.A 節)。承認された同等性・同質性評価プロトコル下で実施された変更に適応される報告カテゴリーについての提案を含むことを推奨する。同等性・同質性評価プロトコルの査読にあたっては、申請者から提案された報告カテゴリーを評価し、提案に対する考えを伝えることになる。CMC 上の特定の変更についての報告カテゴリーの決定は、同等性・同質性評価プロトコルの承認プロセスの一部に含まれる。

7. 承認された同等性・同質性評価プロトコルを使用しても明らかにされない同等性・同質性

製造工程の変更によっては、より詳細な理化学的試験、生物学的試験、薬理的試験、PK/PD 試験、有効性試験、安全性試験なしには製法変更前の製品との同等性・同質性が示されない場合も考えられる。プロトコルにおいてそのような場合にとるべきステップを明確にすることを推奨する (III.C 節参照)。

8. 誓約

同等性・同質性評価プロトコルが不用となった時には、アップデートするか取り下げることを、当該プロトコルのなかで誓約するように推奨する (IV.D 節参照)。

B. FDA は同等性・同質性評価プロトコルにおいて触れるべき製造工程における変更について特別な関心を有しているか？

V.A 節で述べた一般的な考慮に加えて、製造工程における変更に関連して以下の点について考慮するよう推奨する。

1. 物理的・化学的特性解析および生物学的特性解析

同等性・同質性評価プロトコルには、製品の特性が製法変更によって影響を受け、製品の安全性や有効性に影響を及ぼす可能性がある場合、製法変更前後の製品の物理的・化学的および生物学的特性解析を比較するための計画を含むべきである。組換え DNA-由来タンパク質製品およびその他の製品については、適切な場合は、特性解析には構造解析 (例えば一次、二次、三次、四次)、糖鎖解析、バイオアッセイを含む。

2. 不純物プロファイルの比較

同等性・同質性評価プロトコルには新しい工程によって製造された製品の不純物プロファイルを決する計画が含まれるべきである。その研究では、製品関連不純物や、適用できるのなら細胞基由来、細胞培養由来、ダウンストリーム由来不純物を含む工程由来不純物を評価すべきである。新しい不純物

あるいは混入物質がないことを示し、下流での処理 (例えばクリアランス研究) によって除去、不活化されていることを示すことを推奨する。不純物プロファイルに変化がないことを確認すべきである。

もし承認を受けた同等性・同質性評価プロトコル下での変更の実施の間に、不純物の安全性を評価するための非臨床あるいは臨床試験が必要であることがデータによって示された場合には、承認を受けた同等性・同質性プロトコル下での変更は適当ではないかもしれない (III.C 節、V.A.7 参照)。

3. 下流の工程への影響

下流の工程への変更の影響を調べることを推奨する。精製工程などの下流の工程は、上流工程の収量の増加や不純物プロファイルのシフトなどによって影響を受けやすい。例えば、有害物質の除去あるいは不活化は生物由来物質や試薬を含む工程では再評価されなければならないかもしれない。同等性・同質性評価プロトコルの中で、製造工程全体がどのようにして適切にコントロールされるか考察することを推奨する。

4. 工程管理および中間体やインプロセス物質の管理への影響

新しい管理値の実施、あるいは承認された管理値からの変化を確認するとともに妥当性を示すことを推奨する。プロトコルの中に、不純物や混入物の不活化、除去に関するバリデーションの実施が示され、適切な場合は新しい製造工程について再バリデートすることが示されていること。

C. FDA は同等性・同質性評価プロトコルの中で言及されるべき分析法における変更について特別な関心を有しているか？

分析方法の変更に関する同等性・同質性評価プロトコルは分析方法の変更のバリデーション計画を提供すべきであり、プロトコルが既存の分析方法を変更するため (即ち同じ原理を用いる)、あるいは他の分析方法への変更のために用いることができるかどうか示すべきである。分析方法に関して提案された変更は、分析方法を改善し、あるいは有意に分析特性 (分析法、バリデーション、使用目的の種類に関する (例えば、精度、正確さ、特異性、検出限界、定量限界、直線性、測定範囲)) を変更しないように、同等性・同質性評価プロトコルをデザインするよう推奨する。

分析方法のバリデーションには、方法の適格性に関する評価が含まれる。バリデーション計画の中に、精度、範囲、的確性、特異性、検出限界、定量限界のような関連バリデーションパラメータに関する許容限界が示されるべきである。それらのパラメータに関する許容限界によって分析方法は使用目的に照らして適切であることが保証されるべきである。バリデーション計画において、変更した方法は

原法に比べて緩衝液／溶液、製品関連汚染物、あるいは製剤中にある他の成分によって影響を受けやすいかどうか評価される。計画の中において、用いる統計的解析、二つの方法を比較するための製品テストを実施する予定であるかどうかについて明らかにすべきである。二つの工程を比較するための製品試験を行う計画の必要性は、提案された変更の程度、製品の種類、試験の種類（例えば、化学的、生物学的）によって異なる。出荷管理、工程管理のために新しい分析方法を使用するとき、承認された判定基準がもはや必要とされないことを FDA から指摘された場合を除いて、申請書の中で承認された試験を削除したり、判定基準を緩和させるべきではない。

D. FDA は同等性・同質性評価プロトコールにおいて言及されるべき製造設備の変更に特別な関心をよせているか？

同等性・同質性評価プロトコールは、申請者が異なる設備を使用する計画を有している場合、あるいは異なる設備となるであろう設備の変更を計画している場合に有用である。異なる設備には新しいモデル、性能の変更、製造材料（例えばガラスラインタンクからステンレススチール製への変更）、設備デザインや設備操作原理における変更が含まれる。追加の二重工程ライン（例えば醗酵ライン）あるいは承認を受けている製造施設へ設備が追加された際にも、同等性・同質性評価プロトコールは有用である。同等性・同質性評価プロトコールが適切であるかを決定する前に、製造工程への影響という点から変更の種類を評価することを推奨する。変更を促進できるように、必要に応じて FDA と早期に意見交換を開始するよう薦める。

E. FDA は同等性・同質性評価プロトコールにおいて言及すべき製造施設の変更に特別な関心を寄せているか？

同等性・同質性評価プロトコールの有用性はしばしば変更の適用範囲、場合によっては査察の必要性によって制約される。例えば、新しい施設への移行は多くの変更を伴い（例えば新しい設備、製造工程の変化）、新しい施設は同等性・同質性評価プロトコールが考えられたときにはわかっていないものであり、建設されていないため、同等性・同質性評価プロトコールの一部として明確にすることは困難である。多くの変更を含め、施設の変更に、同等性・同質性評価プロトコールの適格性を注意深く考慮することを推奨する。事業所の記述の部分で述べられた適用要求のあるバイオロジクスに関しては、同等性・同質性評価プロトコールが有用でありうるケースがあるかもしれない。早期に FDA と情報交換することを推奨する。

製法変更があった製品の出荷に先立って、cGMP が遵守されているか確認するため承認前査察が必

要とされる CMC 上の変更がある。FDA がそのような承認前査察を必要としているか決定するので、II.E.節に上げられたガイダンス文書を参照するか、FDA に相談してほしい。承認前査察が必要な場合、同等性・同質性評価プロトコールにおいて査察の要求を認め、異なった原薬製造場所あるいは異なる製剤製造場所で製造された製品は、FDA が新しい製造場所において cGMP の遵守を確認するまで出荷しないことを認めること。さらに、無菌操作によって製造された製品の場合、異なる施設あるいは区域（例えば、同一構内の部屋あるいは建物）において製造された製品は、施設あるいは区域が cGMP に遵守していることが確認された時のみ出荷できることを、プロトコールに明記する。また別の種類の場所（例えば、原薬中間体製造場所、包装、試験研究室）への移動については、移動場所で製造された製品は、cGMP が満足されない限り出荷しないことをプロトコールに明記する。

BLA に関しては、既存の施設でのいくつかの大きな変更（即ち、製品に悪影響を及ぼす実質的な可能性をもつ変更）では、21 CFR 601.2(d)のもと、変更を受けた製品の出荷に先立ち、cGMP の遵守の確認が必要だろう。大きな変更に関しては、製品は cGMP の遵守が満足されなければ出荷されないことを同等性・同質性評価プロトコールに明記する。

同等性・同質性評価プロトコールは、バイオロジクスおよびタンパク質性製品の生産施設において、承認された生産区域に製品を追加する場合に、有益である。更に、BLA あるいは BLA への承認後補足文書の形で施設／事業所情報を伴った製品に関しては、FDA は以下を含む変更に関しては報告カテゴリーの引き下げを行わない可能性もある。

- 設備あるいは付属設備（例えば、新しい暖房およびエアークレージング；無菌操作による製品のための新しい充填ライン）における大きな変更（例えば、注入システムのための水の変更）の場合
- 封じ込めが重要な施設の承認された製造区域への追加製品の導入（例えば遺伝子治療用ベクター製造のような生きたウイルスを使用する製造操作、あるいは不活化ウイルスワクチンの最終操作）の場合

F. 同等性・同質性評価プロトコールは容器包装システムの変更に有用であるか？

有用である。過去において、申請者は容器包装システムの変更の際に、プロトコールを使用しており、使用を続けている。同等性・同質性評価プロトコールは、容器包装システムの変更の繰り返しにも特に有用である。

G. 工程分析技術（PAT）の実施あるいは変更は同等性・同質性評価プロトコールにおい

て言及すべきか？

工程分析技術の導入あるいは変更は、同等性・同質性評価プロトコール中に言及可能と期待している。FDA と早期に情報交換をすること。将来、PAT に関するガイダンスの発表を予定している。

H. マスターファイルは申請者の同等性・同質性評価プロトコールと相互参照できるか？

CMC 上の変更のために作成した（例えば容器の樹脂）同等性・同質性評価プロトコールでは、マスターファイルを相互参照できる。承認された同等性・同質性評価プロトコールを用いて実施された承認後の CMC 上の変更についての報告時に、プロトコール中で、マスターファイルを査読することを認める記述をしてもよい。同等性・同質性評価プロトコールにおいて、マスターファイル中で参照すべき情報の種類（例えば、プラスチック樹脂の製造情報および剤形情報）、新材料の適格性を明らかにするために実施する研究（例えば承認された規格）、同等性・同質性研究、安定性研究）のような情報を示すことを推奨する。

I. 同等性・同質性評価プロトコールはマスターファイルの中に含まれるべきか？

同等性・同質性評価プロトコールはマスターファイルの中に含まれることもありうる。プロトコールは CMC 上の変更のために相互参照されうる。製品の PAS の申請において、マスターファイルの査読を認める記述を含むべきである（21 CFR 314.420(b)）。同等性・同質性評価プロトコールは製品特異的である。したがって、PAS の申請において、同等性・同質性評価プロトコールを作成し、製法変更後の製品の適格性（例えば承認された規格、同等性・同質性評価研究、安定性研究）を示すために実施する追加試験を特定することによって、マスターファイル中の情報を増やすことになる。普通、単独にマスターファイルの査読はせず、マスターファイルへの申請の承認、非承認はない。

C. 1. 2. 2 同等性・同質性評価プロトコールのマニュアルガイダンス案からみえてくるもの

今回の案の内容は以上であるが、同等性・同質性評価プロトコールの手引きとして詳細な内容となっており、米国でこのプロトコールシステムが定着しつつあることが伺われる。

内容を見ると 1997 年のガイダンスがプロトコールの目的、基本的な分類の説明であったのに対し、今回のガイドラインは具体的に記述すべき内容にまで解説が進んでいる。しかし基本的な部分においても変更点がある。一つは報告カテゴリーが 3 通りから 4 通りに増えたことである。即ち製品の品質へ影響が出る可能性が中程度に予想されるケースの場合、30 日前告知のみであったのを、さらに 0 日

告知 (CBE) と 30 日告知 (CBE-30) に分類したことである。その理由として、プロトコールシステム運用の経験により、従来 30 日告知としていたような変更でも、報告あるいは評価が適切になされており、実際に提出された例からも、問題は生じないと判断できるケースがあるためとしている。このようなケースがあることは 1997 年のガイダンスでも触れていたが、本ガイダンス案では、そのケースをカテゴリー化し、3 類から 4 類に増やしている。FDA が実際にどのような変更をこのカテゴリーにあてはめているか具体例が注目される。

さらに、このガイドライン案では、同等性・同質性評価プロトコールの作成が困難と思われるケースについて III.C の中に触れている。例示されているのは

- CMC 上の変更に関する、特定しない (nonspecific) 計画
- 製品への有害な影響を、事前に設定した試験、研究、分析方法、および判定基準では評価しえない CMC 上の変更
- 研究中の新薬 (IND)、研究中の新動物薬 (INAD)、あるいは新適用の申請を保証するような CMC 上の変更
- 変更の影響を評価するために有効性、安全性 (臨床あるいは非臨床)、あるいは PK/PD データ (例えば、剤型の変化、新しい不純物の評価のための臨床あるいは非臨床試験、不純物の評価、あるいは免疫原性/抗原性の評価) を必要とするような CMC 上の変更

である。このような例が挙げられたことから予想されることは、同等性・同質性評価プロトコールのシステムは製法変更の中でも、品質特性の評価によって結論が下せるような場合に用いられているのであって、比較的軽微な変更において有効であることが伺われる。

このように同等性・同質性評価プロトコールは米国において生物薬品の製法変更時の同等性・同質性に関する審査において、確立されたシステムとして機能しているようである。即ち、本来ケースバイケースの対応とならざるをえない製造方法の変更について、規制当局との事前相談を同等性・同質性プロトコールという文書システムに変えることにより、作業の軽減を図ったのであろう。しかし、わが国にこのシステムを導入することは極めて困難と言える。もともと（特に CMC においては）規制当局に事前相談のシステムがないわが国において、このシステムを導入しプロトコール制度をとるとしても、そのために多くの人的リソースが必要となり、現状では実行は困難である。したがってこの制度は本来米国のように規制当局に豊富な人的リソースがあって初めて成り立つシステムといえる。とはいえ、米国においてできえ、プロトコールの採用は比較的軽微な変更にとまっていることをみると、同等

性・同質性評価の定型化の難しさを示唆しているといえる。

C.1.3 ICH バイオ医薬品の同等性・同質性評価ガイドライン

平成15年度の大きな動きとしてICH の場でバイオ医薬品の製法変更時の同等性・同質性ガイドライン(Q5E)がステップ2に達したことが挙げられる。このテーマは2002年2月のブリュッセル会議でコンセプトペーパーが採用され、その後専門家による1回の非公式会議(ワシントン)、4回の公式会議(舞浜、ブリュッセル、ワシントン、大阪)を経てステップ2として合意を得たものである。(川西資料2:原文、川西資料3:日本語訳)

C.1.3.1 ICH バイオ医薬品の同等性・同質性評価ガイドラインの論点

ステップ2に至るまでの主な論点をまとめると以下のようになる:

(1) 適用対象:物質としてはICH-Q6B ガイドラインと同様であることは日米欧間で当初より合意がなされていたが、後発品を適用対象とするか否かで欧米と日本との間で大きな見解のずれが生じた。科学的には後発品についても同じ原則で評価が可能という見解は国際間で大きな違いはない。しかし欧米は、後発メーカーの場合、先発メーカーが有している開発経験や歴史的データが手元になく、同等性・同質性評価にあたって、適切な比較を行うことは不可能、という理由で適用対象から外すという主張に終始し、このガイドラインでは後発品は適用外となった。

(2) 同等・同質とは?:バイオ医薬品にとって何をもって「同等・同質」とみなすかについて問題となった。タンパク質性医薬品の多くは本質的に不均一性がある。そこでこのガイドラインでは「同等性/同質性とは、必ずしも変更前および変更後の製品の品質特性が全く同じであるということの意味するものではなく、むしろ、変更前後の製品の類似性が極めて高いこと、ならびに、既存の知識から、品質特性が多少違って最終製品の安全性や有効性には影響を及ぼさないであろうことが十分に保証できることを意味する。」とされた。

(3) バイオ医薬品の同等性・同質性評価作業の原則:「同等性/同質性は、品質特性に関わる試験(理化学試験、生物学的試験)、そして場合によっては、非臨床試験データおよび臨床試験データを組み合わせることで判定される」とし、品質特性(安定性を含めた製品の比較および工程の解析・管理)の比較をまず行い、その結果に応じて、非臨床試験・臨床試験との組み合わせによって結論を導く考えが明確にされた。

(4) 製法変更のタイミング:開発段階での変更はケースバイケースであることが多く一般論としてガイドライン化することは困難。ただし本ガイドラ

インは開発段階での製法変更も考慮して一般原則を定め、開発段階での製法変更については、別途章を設けることとした。

(5) 非臨床試験、臨床試験による同等性・同質性評価:ステップ2の合意後に専門家の意見を求めることとした。

C.1.3.2 ICH バイオ医薬品の同等性・同質性評価ガイドラインにおいて残されている問題点

(1) 非臨床試験、臨床試験:ICH-Q5Eガイドラインは品質分野の専門家によって作成されたものであり、これから非臨床、臨床分野の専門家からコメントを求めることとされている。特にヒトにおける抗原性評価の重要性については、欧米からしばしば指摘されるところである。しかしながら、トランスジェニック動物を用いた実験系の提案がなされてはいるが、従来の特性解析手法以上のもので、実際に抗原性の予測に有効であることが明らかとなった実験系はまだない。したがって、抗原性については市販後調査を厳格に行うこと以外には、現実的な対応は見出せないのが現状であろう。

(2) 後発品の同等性評価:バイオ医薬品についても、単純タンパク質を目的物質とするような製品については、近々にも後発品が出現することが予想される。米国においては、略式新薬申請ANDAによるバイオロジクスは法律上認めていなかったが、通常組換えタンパク質性医薬品については、担当部局がCBERがCDERに移ったことも関係してか、後発品の出現に対する準備を開始していると聞く。一方欧州では、同等性・同質性ガイドラインの適用対象に既に後発品を入れている。したがって、わが国においても後発品の同等性・同質性評価について、基本的な考え方を整備する必要がある。

C.2 生物薬品の特性・品質解析、品質評価法の検討

近年、従来型の組換えタンパク質性医薬品に加え抗体医薬品、融合タンパク質、糖鎖改変タンパク質等、新しい分子設計に基づくバイオ医薬品が続々と開発されている。これらのバイオ医薬品の多くは糖鎖含有タンパク質である。エリスロポエチン、組織プラスミノゲンアクチベータや抗体医薬品に関する研究に代表されるように、糖タンパク質の糖鎖部分は活性等において重要な役割を果たしていることが明らかにされている。しかし、糖鎖の付加を人為的に制御することは依然として困難であり、糖鎖含有タンパク質性医薬品の特性・品質解析、及び品質評価において、最終産物の糖鎖構造を解析することは重要である。また、糖鎖付加は製造方法の変更の影響を大きく受けることから、昨今の国際的重要課題の一つである医薬品の製造方法変更時における同等性/同質性評価において、糖タンパク質の同等性/同質性評価がとりわけ大きな問題となって

いる。このような背景のもと、糖タンパク質性医薬品の糖鎖部分の構造を簡便・迅速に解析する技術の開発が国際的に望まれている。

我々はこれまで、グラファイトカーボンカラムを用いた液体クロマトグラフィー (LC) によって糖鎖を分離し、オンラインエレクトロスプレーイオン化-質量分析法 (ESIMS) を用いて構造を解析する糖鎖プロファイリング法を開発し、糖鎖含有タンパク質性医薬品の特性解析、及び同等性/同質性評価に応用することを検討してきた。本年度は、糖鎖プロファイリングを糖タンパク質性医薬品の糖鎖試験法として利用することを検討した。糖鎖試験法としては、単糖分析や各種 HPLC を用いた糖鎖プロファイリングが用いられているが、情報量が限られていること、また、規格値が設定しにくいこと等の問題が残されている。そこで LC/MS を試験法として利用するためには、再現性と定量性の向上が重要課題であると考え、安定同位体標識化合物を用いた内部標準法の導入を検討した。糖鎖標識法としては、現在国内で最も利用されているピリジリアミノ化(PA)を採用し、この重水素置換体を内部標準物質として用いることによって、LC/MS の特性を生かし、且つ再現性及び定量性に優れた単糖組成分析、及び糖鎖プロファイリング法の開発を目指した。

C. 2.1 安定同位体標識化の検討

外部標準法を用いた場合の MS の再現性は 20%前後とも言われており、MS を試験法として導入するためには再現性の向上が重要な課題である。そこで、糖鎖プロファイリングにおける再現性を高めるため、安定同位体標識糖鎖を内部標準物質として用いる方法を検討した。糖鎖の標識方法として、還元末端をアミノピリジンで還元アミノ化し、PA 糖鎖とする方法がよく用いられている。そこで、標準単糖または糖鎖の還元末端を d_6 -AP で標識して d_4 -PA 糖鎖とし、内部標準糖鎖として用いることを検討した (Fig 1)。標準単糖を用いて標識化を検討したところ、市販の d_6 -AP に含まれる不純物のため d_1 、 d_2 、 d_3 -PA-単糖が得られたが、これらはキャピラリー GCC カラムを用いた LC/MS (CapGCC-LC/MS) による d_6 -PA 単糖の分析には影響を与えないことが確認された (Table 1)。

C. 2.2 単糖組成分析

はじめに、市販の d_6 -PA-単糖 (Gal, Man, Glc, Fuc, GlcNAc 及び GalNAc、各 1 pmol) を CapGCC-LC/MS に注入し、SIM モードで分析を行った。Fig. 2A は m/z 259 (d_6 -PA-Gal、 d_6 -PA-Man 及び d_6 -PA-Glc)、 m/z 243 (d_6 -PA-Fuc)、及び m/z 300 (d_6 -PA-GlcNAc 及び d_6 -PA-GalNAc) をモニターしたときに得られたトータルイオンクロマトグラム (TIC) である。すべての d_6 -PA 単糖が 2 分程度の差でベースラインにおいて分離され、ピーク形状も良好であった。また、検出限界 (S/N=3) は 45 fmol であっ

た。

つぎに、 d_6 -AP を用いて d_4 -PA 単糖を調製し、内部標準物質として d_6 -PA 単糖に添加して CapGCC-LC/MS 分析を行い、 m/z 243、259、300 と、 m/z 263 (d_4 -PA-Gal、 d_4 -PA-Man 及び d_4 -PA-Glc)、 m/z 247 (d_4 -PA-Fuc) 並びに m/z 304 (d_4 -PA-GlcNAc 及び d_4 -PA-GalNAc) をモニターした (Fig. 2B)。Fig. 2C-2H は各ピークのマスマスペクトルを示している。すべてのピークにおいて m/z 4 異なるペアイオンが検出されていることが確認された。

本分析法の定量性を確認するため、様々な濃度の d_6 -PA 単糖 に対して 1 pmol の d_4 -PA 単糖を内部標準物質として添加し、LC/MS 分析を行った。 d_4 -PA 単糖のピーク面積に対する d_6 -PA 単糖のピーク面積比と d_6 -PA 単糖の濃度の間には 0.05 pmol 以上で直線性が認められた。また、Table 2 に示すように、内部標準単糖を用いることによって、良好な再現性が得られることが確認された。

つぎに、1 から 1000 pmol の単糖 (Gal, Man, Glc, Fuc, GlcN 及び GalN) を用いてアセチル化、 d_6 -PA 化、過剰試薬の除去操作を行った後、併行して同様に調製した d_4 -PA (4 または 20 pmol) を内部標準として添加し、CapGCC-LC/MS 分析を行った。6 種類の単糖のアセチル化、PA 化、脱試薬、及び LC/MS 分析の全過程を通した真度は 80-100% であった (Fig. 3)。また、再現性は 7% 前後であった。

モデル糖タンパク質としてフェツイン及びエリスロポエチンを用いて、本分析法の単糖組成分析法としての有用性を評価した。一般に、糖酸加水分解の条件として、中性単糖分析には糖タンパク質を 2M TFA 中 100°C で 4 時間加熱する方法、またアミノ単糖分析用には 4M HCl 中 100°C で 6 時間加熱する方法が用いられているが、2 回の加水分解操作を行うことになるので、今回、フェツイン及びエリスロポエチン (25 pmol) を 2M HCl-2M TFA 中 100°C で 6 h 加熱する方法を採用した。そして、糖タンパク質の加水分解と併行して、内部標準物質用の Gal, Man, Glc, Fuc, GlcN 及び GalN (各 100 pmol) を同様に 2M HCl-2M TFA 中 100°C で 6 h 加熱した。加水分解後、糖タンパク質由来単糖、及び標準単糖をそれぞれ d_6 -AP 及び d_4 -AP で標識し、GCC-LC/MS に同時注入した。Figs. 4A 及び 4B はそれぞれフェツイン及びエリスロポエチンの単糖組成分析の結果を示している。この図の中で (1)、(3)、(5) はサンプル (d_6 -PA 単糖) のクロマトグラムを示し、(2)、(4)、(6) は標準単糖 (d_4 -PA 単糖) のクロマトグラムを示している。 d_6 -PA 及び d_4 -PA 単糖のピーク面積比から算出された単糖組成分析の結果は文献値によく一致した (Table 3)。

C. 2.3 糖鎖プロファイリング

つぎに、安定同位体標識法を LC/MS による定量的糖鎖プロファイリングに応用することを検討した。モデル糖タンパク質として用いた hCG は胎盤

のシンシチウム細胞で産生される糖タンパク質性ホルモンで、特に妊娠初期に多量に分泌され胎盤形成に寄与していることから、排卵誘発剤として利用されている。hCGは分子量14.7 kDaの α サブユニットと分子量23.0 kDaの β サブユニットの二量体で形成されており、 α サブユニットの Asn-52、Asn-78 及び β サブユニットの Asn-13、Asn-30 にN結合型糖鎖が結合していることが報告されている。今回はhCGからNグリカナゼ処理により糖鎖を切り出し、PA化後、分析に用いた。

C. 2. 3. 1 PA化糖鎖のイオン化の最適化

ESIMS分析において、糖鎖のイオン化効率は脂質、タンパク質及びペプチドなど他の有機物と比較して著しく低く、糖鎖分子の揮発性を高めるPA化などの標識化は、検出感度を向上させるために非常に有用であることが知られている。しかしながら、糖鎖のラベル化はイオン化効率が向上する反面、糖鎖のイオン化に必要とするイオン化エネルギーが減少するため、余剰エネルギーによるフラグメンテーションを引き起こす原因となる。フラグメントイオンはイオン化の際にプロトン化されるために m/z 値から分子イオンと区別することができない。このようにして生じたフラグメントイオンは糖鎖のプロファイリングを困難にすることが予想される。そこでまず、ESIMSにおけるPA化糖鎖の最適なイオン化条件の設定を試みた。

ポジティブイオンモード及びネガティブイオンモードで d_6 -PA-uhCG糖鎖を分析し、アシアロ複合型2本鎖糖鎖に相当するイオンのみを抽出した(Fig. 5)。ポジティブイオンモード(Fig. 5A)で測定した場合、ピークaとともにマイナーピークb及びcが検出されたが、ネガティブイオンモード(Fig. 5A')ではピークaに相当するピークa'のみが検出され、b及びcに相当するピークは検出されなかった。ESIMS分析においては、低分子量糖鎖であるアシアロ複合型2本鎖糖鎖の分子イオンピークは両イオンモードで検出されることを確認している。従ってFig. 5Aで検出されたピークb及びcは、ネガティブイオンモードでは検出されなかったことから、分子イオンピークではなく他の糖鎖から生成したフラグメントイオンピークであることが考えられた。

Fig. 5B、B'は両イオンモードにおいて共通して検出されたピークa及びa'のマススペクトルである。ピークaのマススペクトル(Fig. 5B)ではアシアロ複合型2本鎖糖鎖(分子量1724.6 Da)に由来する2価イオン($m/z=863.3$)の他に、アシアロ複合型2本鎖糖鎖よりヘキソース(Hex)1分子、及びN-アセチルヘキソサミン1分子分小さい糖鎖(アシアロ1本鎖糖鎖、 $m/z=1359.4$ 、分子量1359.3 Da)、及びこれよりさらにHex1分子分小さい糖鎖($m/z=1197.2$ 、分子量1197.2 Da)に相当するスペクトルが強く検出された。一方、ネガティブイオンモードではアシアロ複合型2本鎖糖鎖(分子量

1724.6 Da)に由来するイオン($m/z=860.9$)のみしか検出されなかった。

以上の結果から、ポジティブイオンモードで測定した場合はフラグメントイオンが生成し、マススペクトルが非常に複雑になることが明らかとなった。従ってポジティブイオンモードではPA化糖鎖の分子イオンピークの同定が難しいことからESIMSによる糖鎖のプロファイリングにはネガティブイオンモードによる測定が適していると考えられた。

C. 2. 3. 2 安定同位体標識法によるuhCG及びrhCG由来糖鎖の定量的プロファイリング

rhCGを被検体糖タンパク質、uhCGを標準糖タンパク質とし、それぞれを d_7 -AP及び d_6 -APで標識して d_7 -PA-rhCG糖鎖、 d_6 -PA-uhCG糖鎖とし、1対1で混合した。両サンプル中に同一糖鎖が存在する場合、4 Da差のペアイオンが検出され、イオン強度比から相対結合量が求められるはずである。また、一方のhCGにのみ結合している糖鎖が存在する場合、1本のイオンとして検出されると予想される。

Fig. 6Aは d_7 -PA-rhCG及び d_6 -PA-uhCGの等量混合液(1 μ g)のTICである。約20~25分に多数のピークが検出された。Fig. 7は糖鎖のプロファイルを保持時間と m/z の2次元で表したものである。また、Fig. 7上の各ピークのマススペクトルをFig. 8に示した。

各マススペクトルを解析した結果、両hCGには合計32種類の糖鎖が結合していることが明らかになり、主な糖鎖は混成型、一本鎖及び2本鎖の複合型糖鎖と推定された(Table 4、5)。11種類検出された混成型糖鎖のうち、ペアイオンが検出されたのは糖鎖a1($m/z=757.5$ 、759.5)のみであった。これらは m/z 値の差から2価イオンであることがわかり、計算分子量1517.0、1521.0 Daから、糖組成式[Hex]₃[HexNAc]₃の混成型糖鎖と推定された。19種類検出された複合型糖鎖のうち糖鎖n1、n2、n4、n5、r1、r2及びr4の7ピークからペアイオンが検出された。これらはマススペクトルの値からフコースが結合していないモノシアロ及びジシアロ複合型2本鎖糖鎖と推定された。

共通糖鎖の結合量の違いを調べるため、uhCGに結合している糖鎖に対するrhCGの糖鎖の相対結合比を求めた(Fig. 9)。糖鎖n1、n2、n4及びn5は両hCGに共通に存在する異性体であるが、rhCGにはいずれもuhCGの50~70%程度しか結合していないことがわかった(Fig. 9A)。また、ジシアロ複合型2本鎖糖鎖についても同様に検討した結果(Fig. 9B)、rhCGではr2が主要な糖鎖であり、結合量はuhCGの約4倍であるが、uhCGではr4が最も結合量が多く、rhCGの約2倍の結合量であることがわかった。以上のように、モノシアロ糖鎖はuhCGに多く、ジシアロ糖鎖はrhCGに多いこと、また、複合型糖鎖の異性体分布に差が認められることから、ヒトと