

CHO 細胞ではシアル酸転移酵素や複合型糖鎖合成酵素の発現に差があることが示唆された。

同位体標識法による糖鎖プロファイリングにおいて、どちらか一方に特異的に結合している糖鎖はマススペクトル上で単独のイオンとして検出される。Table 4 に示したように、rhCG では9種類の糖鎖が単独イオンとして検出され、そのうち6種類は混成型糖鎖であった。複合型糖鎖で単独イオンとして検出されたものは3種類で、このうちモノシアロ複合型2本鎖糖鎖(n3)及びジシアロ複合型2本鎖糖鎖(r3)は、共通糖鎖として検出された糖鎖 n1、n2、n4、n5 及び r1、r2、r4 の異性体であり、rhCG にしか結合していない異性体が存在することが明らかになった。

uhCG にのみに結合している糖鎖として、12種類の糖鎖が検出された (Table 4)。その中で4種類は混成型で、8種類は複合型糖鎖であった。これらの糖鎖の多くはフコースが結合していることが明らかになった。

以上の結果から rhCG には混成型糖鎖が多く結合しているのに対して、uhCG にはフコシル化糖鎖が多く結合していることが明らかになった。また、フコースが結合していないモノ及びジシアロ複合型2本鎖糖鎖のように、一方にのみ結合している異性体が存在することが明らかとなった。uhCG と rhCG を同時に分析して得られた Fig. 7 上のすべてのピークをアサインし、uhCG 由来糖鎖と rhCG 由来糖鎖をそれぞれ抽出した結果、Fig. 5B、5C のようなパターンが得られ、両者は全く異なった糖鎖プロファイルを有していることが分かった。今回のモデル実験により、同位体標識法を利用することによって、同一クロマトグラム上での糖鎖の定量的差異解析が可能であることが確認された。同位体標識法では単回分析、つまり同一測定条件における分析が可能のため、1回の測定で迅速且つ正確な定量的差異分析が可能である。従って同位体標識法は糖鎖試験法として有用なツールになり得ると考えられる。

#### C. 2.4 考察

これまで我々は LC/ESI-MS を用いた独自の糖鎖プロファイリング法を開発し、様々な糖鎖含有タンパク質性医薬品の特性・品質解析、品質評価、及び同等性/同質性評価に役立てることを検討してきた。MS は特性解析法としては威力を発揮することを明らかにしてきたが、試験法としての潜在能力は不明であった。そこで、本研究では、標準単糖や標準糖タンパク質由来糖鎖を安定同位体標識し、被検体糖鎖と同時に分析することによって、MS の課題である再現性を克服し、糖鎖試験法として利用することも可能であることを明らかにした。

はじめに単糖組成分析を検討し、糖タンパク質の加水分解に併行して標準単糖を同条件下加熱し、糖タンパク質由来単糖を  $d_6$ -AP で、また、標準単糖を  $d_6$ -AP で標識した後、同時注入することによって、

精度及び真度が改善されることを確認した。本分析法は、従来の HPAEC-PAD と比較して感度も高く、今後、医薬品のみならず、グライコミクスなどへも応用が可能と考えている。

つぎに安定同位体標識法を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。uhCG を標準糖タンパク質、また rhCG を被検体糖タンパク質としてそれぞれ  $d_6$ -及び  $d_6$ -AP で標識し、1対1で混合して同時注入することによって、一方にしか存在しない糖鎖の構造推定、あるいは共通糖鎖の構造推定と相対結合比の算出が可能であることを確認した。今後、分析例を増やすことによって、糖鎖試験法としての有用性を総合的に判断していきたいと考えている。

### C. 3 抗体医薬品の現状と問題点

抗体医薬の始まりは19世紀終わりのエミール・ベリングと北里柴三郎による血清療法にさかのぼる。彼等は加熱変性させたジフテリア菌毒素をウサギに注射することにより、ジフテリアに対する抵抗性を獲得させた。さらに、そのウサギの血清を他のウサギに注射すると、ジフテリアに対する抵抗性をワクチンの接種されていないウサギに移せることを発見し、これをヒトに応用した。その後、ヒト血液から精製したγグロブリン製剤が開発され、老人や術後の患者の日と見感染症、川崎病の自己免疫病に多用されている。1975年にモノクローナル抗体作成技術がケラーとミルシュタインにより開発されてから、ターゲットに対して高親和性と高特異性を示すマウスモノクローナル抗体は基礎研究だけでなく治療薬を目指した膨大な研究が行われてきた。実際、モノクローナル抗体治療薬は①分子化合物に比較して基本的に細胞毒性が低いもしくは無い、②比較的長期にわたり血中濃度の維持が容易である、③結合対象となるリガンド選択性・特異性に優れている、④抗原の捕捉だけでなく生体内からの排除が可能である、といったメリットがある。しかしながらマウスモノクローナル抗体の治療薬としての利用はヒトへの免疫原性により繰り返し投与時の効果の減弱、アナフィラキシーショックの危険性のために、非常に限られたものであった。そこで、免疫原性、アナフィラキシーショックの危険性を低減し、繰り返し投与を可能にするヒト型モノクローナル抗体を作成する様々な技術が生み出されてきた。このようにして作成されたヒト型モノクローナル抗体の一部は既に医薬品として承認され臨床で用いられており、また現在臨床応用を目指して開発中のものも多い (Table 6、7)。そこで抗体医薬の現状と問題点について概説する。

#### C. 3.1 抗体医薬の作成

##### C. 3.1.1 キメラ抗体、ヒト化抗体

キメラ抗体は遺伝子組換え技術を用いてマウス

モノクローナル抗体の C 領域をヒト抗体の C 領域に置き換えたものである (Fig. 10)。ヒト化抗体は抗体タンパク質の三次元構造をもとに、抗原が実際に結合する超可変領域 (CDR1~3) を残して、それ以外の部分であるフレームワーク (FR) を全てヒト抗体に置き換えたものである (Fig. 10)。以下にマウスハイブリドーマ細胞から、遺伝子として cDNA を用いた遺伝子組換え法によるキメラ抗体、ヒト化抗体の作製法を紹介する (Fig. 11)。

### (1) マウス抗体遺伝子のクローニング

第一のステップは、マウス抗体産生ハイブリドーマからのマウス抗体をコードする遺伝子 (以下マウス抗体遺伝子) のクローニングである。ハイブリドーマ細胞より RNA を抽出し、①cDNA を作製後、ブランクハイブリダイゼーション法あるいは PCR 法により抗体遺伝子をクローニングするか、② RNA より直接 PCR 法により抗体遺伝子をクローニングする方法が用いられている。ハイブリドーマ細胞には、目的の抗体遺伝子以外に、融合パートナーのミエローマ由来の抗体遺伝子、タンパク質に翻訳されない偽抗体遺伝子が含まれていることもある。従って、精製したモノクローナル抗体 V 領域のアミノ酸配列を一部決定し、クローニングした抗体遺伝子と一致しているかにより、クローニングした遺伝子が目的の抗体遺伝子であるかどうかの確認が非常に重要である。

### (2) キメラ抗体遺伝子およびヒト化抗体遺伝子の作製

キメラ抗体は、クローニングしたマウス抗体の V 領域遺伝子にヒトの C 領域遺伝子を連結し、適当な発現ベクターに挿入して培養細胞で生産する。また、抗体産生ハイブリドーマのマウスイムノグロブリン C 領域をヒトイムノグロブリン C 領域に組換える相同組換え法やトランスジェニックマウスによっても作成される。

ヒト化抗体遺伝子の作製は複雑なステップからなる (Fig. 12)。ヒト化抗体作製の第一ステップでは、クローニングしたマウス抗体 V 領域の CDR 配列とヒト抗体 V 領域の FR から成る V 領域をコードする遺伝子を構築する。ヒト化抗体作製における最も重要な点は、CDR を移植するヒト FR 領域のデザインである。マウス抗体の CDR を単純にヒト FR へ移植した抗体では、結合活性の低下、消失がみられる。これはマウス FR 領域中のいくつかのアミノ酸が CDR の高次構造維持に大きな影響を与えており、それらのアミノ酸残基を CDR とともに移植しなければならないことを示している。CDR の高次構造に影響を与えるアミノ酸残基としていくつか同定されているが、その法則は確立されておらず、コンピュータモデリングなどを組み合わせて個々の抗体で試行錯誤しているのが現状である。また、この方策として目的のマウス抗体 V 領域と最も

高いホモロジーを示すヒト抗体 V 領域を選択し、その FR 領域を用いている場合もある。

### (3) 抗体 H 鎖および L 鎖遺伝子発現ベクターの作成および動物細胞における発現

現在、上市されている遺伝子組換え抗体は抗体 H 鎖および L 鎖遺伝子が挿入された動物細胞用の発現ベクターを動物細胞に導入し、発現したものである。

上市された抗体の製造細胞で実績があるのは、チャイニーズハムスター卵巣由来の CHO 細胞、マウスミエローマ由来の NS0 細胞および SP2/0 細胞である。動物細胞が産生に用いられるのは以下の理由による。まず、抗体は H 鎖および L 鎖各 2 本が複数の S-S 結合を介して結合しており、正確な立体構造の構築には動物細胞での発現が最適である。また、抗体の Fc 領域には N 型糖鎖が結合しており、糖鎖は CH2 ドメインの立体構造の維持、複数の後述するエフェクター活性に必須である。従って、動物細胞で発現しないと抗体のエフェクター活性が損なわれてしまう。この点は後述するヒト抗体においても同様である。

動物細胞用の発現ベクターは以下に示すような複数のユニットから構成されている。①抗体発現ユニット：抗体遺伝子、抗体の転写を促進するプロモーターエンハンサー、抗体 RNA を安定化させるスプライシングシグナルより構成、②選択マーカー：動物選択マーカー (G418 耐性遺伝子など)、大腸菌選択マーカー (アンピシリン耐性遺伝子など)、③遺伝子増幅ユニット：抗体発現を上昇させるために抗体遺伝子のコピー数を上昇させる遺伝子増幅ユニット (dhfr 遺伝子系、glutamine synthetase 系など) である。

宿主の動物細胞に発現ベクターをエレクトロポレーション法、リポフェクション法などで導入する。導入した細胞群より、薬剤耐性 (G418 など) を指標として発現ベクターが導入された細胞を選択する。選択された細胞のうちキメラ抗体、ヒト化抗体の発現が認められた細胞についてはさらに遺伝子増幅 (dhfr 遺伝子系など) を行い、安定なキメラ抗体、ヒト化抗体高発現細胞を樹立する。

キメラ抗体あるいはヒト化抗体高発現細胞を培養し、培養上清よりキメラ抗体あるいはヒト化抗体を精製する。初期評価用のキメラ抗体あるいはヒト化抗体はプロテイン A カラムを用いて容易に精製可能である。

#### G.3.1.2 ファージディスプレイヒト抗体

ファージディスプレイ法は大腸菌ウイルスの一つである M13 や T7 などの繊維状ファージのコートタンパク質 (g3p や g10p など) の N 末端側にファージの感染性を失わないよう外来遺伝子を融合タンパク質として発現させるシステムである (Fig. 13)。一度に  $10^7$  種類以上の多種類の分子種を呈示

したライブラリーを構築でき、また粒子ごとに目的の機能や性質をもった分子種を選択できる。その技術を用いて外来遺伝子として抗体の結合部位である2つのポリペプチド鎖  $V_H$  と  $V_L$  を短いリンカーで直列につないだ一本鎖を Fv (single-chain Fv; scFv) ファージにディスプレイさせたものが抗体ファージライブラリーである。そしてファージライブラリーからパンニングと呼ばれる固相化された抗原分子上で特異的抗体ファージを濃縮する操作を繰り返して特異的抗体ファージをスクリーニングする (Fig. 14)。それを最終的にファージから切り離れたものがファージディスプレイ抗体である。

現在、世界中で様々な抗体ライブラリーが作製・報告されているが、その抗体遺伝子ソースの性質の違いに応じて、以下の3つに分類される (Fig. 15)。

### (1) 免疫ライブラリー

感染症回復者や対象抗原をワクチン接種して血中抗体価を上昇させたヒトや、自己抗体を保有する患者、担癌患者などのリンパ球を出発材料として RTPCR により増幅した V 遺伝子より構築したライブラリーである。中和抗体を有する各種感染症に対する抗体の創出に有効と考えられる。

最初から目的抗体遺伝子がライブラリー中に多く含まれていることから、比較的小さなサイズのライブラリーからでもかなり高い確率で特異性、親和性の高いヒト抗体を単離することが可能である。一方、対象抗原によっては、リンパ球ソースの入手方法の点など倫理的な面で問題となることもある。さらに対象抗原ごとにあるいは患者ごとにライブラリーを構築しなければならないため、手間がかかるという欠点がある。ヒト第VIII因子 (FVIII) に対するインヒビター抗体を有する患者から、本法により FVIII に高い親和性 ( $K_d=10^{-11}M$ ) を有し、FVIII の活性を阻害する scFv クローンが得られている。

### (2) ナイーブ/非免疫ライブラリー

正常なヒトが保有する  $V_H$ 、 $V_L$  遺伝子を RTPCR により分離し、ランダムに組み合わせた抗体可変領域ドメインを提示したライブラリーである。ヒトがもともと生体内に有し、産生している抗体可変領域を組み合わせて作製するため、ヒト抗原に対する治療用のヒト抗体作製に、最もよく利用されている。通常、正常人の末梢血、骨髄、扁桃腺などのリンパ球を出発材料とし、複数のドナーを用いることでより多くの多様性を有するライブラリーを構築する。このライブラリーでは用いるドナーがどのような疾病歴、抗体価、遺伝系などのバックグラウンドを有するかなどの選択が難しく、V 遺伝子の組成や由来のコントロールに課題がある。厳密に言えば抗原感作によるクラススイッチが起こっていないという観点から、IgM クラスの mRNA のみを  $V_H$  遺伝子の増幅に用いているものが特にナイーブライブラリーと呼ばれる。以下にヒト抗体ライブラリーの

構築 (B 細胞を出発材料としたナイーブ/非免疫ライブラリーの場合) 法の概略を示す (Fig. 16)。

ヒトリンパ球由来 mRNA から、イムノグロブリンの  $\gamma$ 、 $\mu$ 、 $\kappa$ 、 $\lambda$  鎖の定常領域に特異的なプライマーを用いて、V 遺伝子の cDNA を作製する。次に、各遺伝子 ( $\gamma$ 、 $\mu$  鎖由来の  $V_H$  ならびに  $\kappa$ 、 $\lambda$  由来の  $V_L$ ) を V 遺伝子ファミリーに特異的な DNA プライマーのセットを用いて V 遺伝子の cDNA を作製する。次に、各遺伝子 ( $\gamma$ 、 $\mu$  鎖由来の  $V_H$  ならびに  $\kappa$ 、 $\lambda$  由来の  $V_L$ ) を V 遺伝子ファミリーに特異的な DNA プライマーのセットを用いて合成し、それらリンカーDNA を用いて PCR により連結し、scFv 遺伝子を作製する。それをファージタンパク質 g3p の N 末端に融合タンパク質遺伝子としてファージミドベクター上で連結させ (Fig. 13)、大腸菌に形質転換後、ヘルパーファージを用いて、ファージディスプレイ抗体ライブラリーを調製する。

### (3) 合成ライブラリー

ヒト B 細胞内で実際に抗体産生に用いられている遺伝子を選び、V 遺伝子断片と CDR3 領域に相当する適当な長さのランダムなアミノ酸配列をもつ合成 DNA を用いて抗体可変領域遺伝子を構築したライブラリーである。最初から機能的な scFv を産生する  $V_H$  と  $V_L$  遺伝子の組み合わせでライブラリーを構築することができるため、得られる抗体の発現効率や安定性が高いとされる。人工的なランダムオリゴ DNA を用いているため、ゲノム中の抗体遺伝子のみを利用した抗体ライブラリーよりも高多様性が得られる。逆に特定の CDR 領域のみの多様性であるため、他の CDR 領域が多様性に寄与するような抗体は得られない。

#### C.3.1.3 トランスジェニックヒト抗体

完全なヒトモノクローナル抗体取得のもう一つの戦略は、ヒト抗体を産生するトランスジェニック動物の利用である。内因性免疫グロブリン (Ig) をノックアウト (KO) したマウスに機能的なヒトの Ig 遺伝子を導入すれば、マウス抗体の代わりに多様な抗原結合能を持つヒト抗体が産生されると想像される。さらに、このマウスを免疫すればヒトモノクローナル抗体を従来のハイブリドーマ法で容易に得ることが可能と考えられる。

#### (1) ヒト抗体重鎖、軽鎖ミニ遺伝子を導入したヒト抗体産生マウス

ヒト抗体重鎖、軽鎖ミニ遺伝子を導入したトランスジェニックマウスとマウス内在性抗体遺伝子を破壊したノックアウトマウスを掛け合わせてヒト抗体産生マウスを作成する (Fig. 17)。抗原を接種したヒト抗体産生マウスから通常のハイブリドーマ法によりヒトモノクローナル抗体を作成する。また、抗原を接種したヒト抗体産生マウスの抗体産生細胞を胸腺から分離し、抽出した遺伝子を CHO 細

胞に導入しヒト抗体を産生させる技術も開発されている(Fig. 18)。本法により IL-8、EGFR、TNF- $\alpha$ 、CD4 などに対するヒト抗体が得られている。しかしながら、本法では用いるベクターにクローン可能な DNA 長は通常数 kb から数百 kb であり、ヒト抗体遺伝子の全長(重鎖 1.5Mb、軽鎖  $\kappa$  2Mb、軽鎖  $\lambda$  1 Mb)を入れることはできない。また、ヒト抗体の一部(IgG の定常領域)はコスミド、BAC(バクテリアの人工染色体)、YAC(酵母の人工染色体)にはクローン化できない。

一方、ヒト Ig 遺伝子において、例えば重鎖の場合、14 番染色体上の約 1Mb にわたってクラスターを形成している約 80 種の V 断片、約 30 種の D 断片、6 種の J 断片が様々に組み合わされた VDJ エクソンが抗原結合部位をコードするが、この過程(VDJ 組換え)が抗体の多様性に大きな役割を果たしている(Fig. 19)。軽鎖  $\kappa$  (2 番染色体、約 2Mb)、軽鎖  $\lambda$  (22 番染色体、約 1Mb) 遺伝子についても同様である。従って、本法ではヒトで観察されるものと同様に多様な抗体レパートリーをマウスで再現するには限界があった。

## (2) KM マウス

このような問題を解決するため、キリンビール社は以下のようにしてヒト抗体重鎖および軽鎖  $\kappa$  遺伝子の全種類を導入したヒト抗体産生マウスを作製し、ヒト抗体を産生することに成功した(Fig. 20)。まず、ヒトマウスハイブリッド細胞の独立クローンからなるライブラリーをスクリーニングし、Ig 遺伝子を含むヒト染色体自然断片(human chromosome fragment; hCF)のなかで重鎖:14 番染色体由来と軽鎖  $\kappa$ :2 番染色体由来を選抜した。選択細胞を 48 時間程度コルセミド処理することにより 1 本~数本の染色体が取り込まれた核膜構造体であるマイクロセルを形成させた。このような状態の細胞にサイトカラシン B を加えて遠心分離して脱核させ、染色体が 1 つ 1 つ核膜、細胞膜に包まれたマイクロセルを分離した。単離したマイクロセルと染色体受容細胞(マウス ES 細胞)をポリエチレングリコールで融合した。このような一連の操作はマイクロセル融合法と呼ばれる。この融合細胞を 8 細胞期受精卵に注入して、擬似妊娠雌マウスの子宮へ移植する。得られたキメラマウスは ES 細胞由来の体細胞においてヒト染色体断片を保持し、導入したヒト染色体上のヒト遺伝子を組織特異的に発現させた。このようにヒト染色体をもつトランスジェニックマウスはトランスクロモマウス(TC マウス)と呼ばれる。ヒト抗体重鎖遺伝子を含む 14 番染色体断片を保持する TC マウス、ヒト抗体軽鎖  $\kappa$  遺伝子を含む 2 番染色体断片を保持する TC マウス、内在性マウス抗体重鎖遺伝子を破壊したマウス(KO マウス)、内在性マウス抗体軽鎖  $\kappa$  KO マウスを交配することにより、4 つの形質をすべて保持するヒト抗体を作るダブル TC/KO マウスを作成した(Fig. 21)。こ

のヒト抗体産生マウスは、ヒト抗原を免疫することにより抗原特異的なヒト抗体(IgG)力価が上昇し、その脾臓から抗原特異的なヒト IgG を産生するハイブリドマクローンを取得された。しかし、そのハイブリドマ取得率は、正常マウスの 10%程度であり、その原因はヒト第 2 染色体の保持率が ES 細胞及び体細胞において低いことによる(Table 8)。

一方、Medarex 社のヒト抗体産生マウス(HuMab)はヒト Ig  $\kappa$  鎖遺伝子の 50%を含むが、重鎖遺伝子は 10%程度しか含まないため、抗原に対する応答性が必ずしもよくないという問題点があった(Table 8)。ヒト Ig  $\kappa$  鎖遺伝子については、一種の可変領域クラスターが倍化した構造のため、一方のクラスター(50%)を含む HuMab マウスにおいても、100%含む場合と比較して遜色のない  $\kappa$  鎖の多様性が生み出されていると考えられる。さらに、HuMab マウスにおいては、Ig  $\kappa$  鎖を含む酵母染色体ベクター(Ig  $\kappa$ -YAC)がマウス染色体 DNA に挿入されているため、安定に保持される。そこで、ダブル TC/KO マウスの不安定な hCF2 の代わりに Ig  $\kappa$ -YAC を導入するという改良がなされた。実際には、ダブル TC/KO マウスをヒト抗体軽鎖  $\kappa$  領域全域の 50%を含んでいる Medarex 社の HuMab マウスと交配させ、ヒト 14 番染色体断片とヒト軽鎖  $\kappa$  トランスジーンとを保持する KM マウス(Kirin-Medarex マウス、KM マウス<sup>TM</sup>)を作成した(Fig. 22)。作成された KM マウスを用いたハイブリドマの取得率、得られた抗体の特異性は、通常のマウスを用いた場合と比較して遜色ない結果が得られている(Table 8)。

## (3) KM マウスの品種改良

### (3.1) KM (Fc $\gamma$ R IIb-KO) マウス

免疫するヒト抗原によってはアミノ酸配列あるいは立体構造上、マウスのものと非常に近いか、同一である場合、抗体が得られにくいことがある。そのような場合に対処するため、自己抗体を産生する Fc $\gamma$ R IIb-KO マウスの形質を入れた KM (Fc $\gamma$ R IIb-KO)マウスも作成されている。

IgG の Fc 領域と結合する Fc 受容体である Fc $\gamma$ R IIb は ITIM (immuno tyrosine inhibitory motif) を細胞質に持つ膜タンパク質である。過剰な抗原・抗体複合体の IgG Fc 領域が B 細胞上の活性化シグナルを入れる Fc 受容体 (Fc $\gamma$ RI) と同時に抑制性シグナルを入れる Fc $\gamma$ R IIb と結合すると、B 細胞への活性化シグナルは遮断され、B 細胞にアポトーシスが誘導され、過剰な抗体産生が抑制される(Fig. 23)。そこで、寛容が打破された Fc $\gamma$ R IIb-KO マウスの形質を KM マウスへ導入するため、交配を行い、KM (Fc $\gamma$ R IIb-KO)マウスが作製された。このマウスをウシコラーゲンタイプ IV で免疫し、ウシとマウスのコラーゲンに共通のエピトープ(抗原決定部位)に反応するヒト抗体の有無が調べられた。通常 KM マウスではマウスコラーゲンに反応する

ヒト IgG 抗体は血清中に観察されなかった。一方、KM(Fc $\gamma$ R IIb-KO)マウスではマウスコラーゲンに結合する抗体を生産するハイブリドーマが得られた。

### (3. 2) H-2D 導入 KM マウス

細胞表面の膜タンパク質を認識するモノクローナル抗体を取得する場合に、ヒト組換えマウス細胞を免疫する方法が用いられる。その際マウスに主要組織適合抗原複合体が異なるマウス細胞を注入すると、強い免疫反応が引き起こされる。このような場合には、免疫原となる組換えマウス細胞と KM マウスの遺伝的背景 (バックグラウンド) を一致させることが望ましい。通常の KM マウスは、H-2k (C3H)と H-2b (C57BL/6)のミックスバックグラウンドであるが、場合によっては H-2d (Balb/c)のバックグラウンドの入った KM マウスも望まれる。そこで、Balb/c マウスとの交配により、H-2d 形質の入った雑種マウスである KM (H-2d) も作製されている。

### (4) HAC マウス

ヒト 2 番染色体の保持率低下を克服する方法として他のアプローチも試みられている。それは軽鎖遺伝子を安定な 14 番染色体断片上に組み込み、ヒト人工染色体 (human artificial chromosome; HAC) を作成する方法である。そこで、テロメア配列を挿入することでヒト染色体を任意の部位で切断する方法を確立し、さらには染色体上に loxP 配列を組み込み、Cre リコンビナーゼを作用させることでヒト 14 番染色体上にヒト 22 番染色体断片を転座させ、ヒト重鎖遺伝子とヒト $\lambda$ 鎖遺伝子を 1 つの染色体にもつ、HAC が作成された (Fig. 24)。実際にはヒト 14 番染色体由来 hCF20 を保持する DT40 細胞において、相同組換えにより loxP 配列が SC20 上の RNR2 遺伝子座に導入された (DT40/SC20)。この loxP 部位は様々なヒト染色体を転座させるための、いわばクロニングサイトといえる。クロニングするヒト染色体領域としては、ヒト 22 番染色体上の Ig $\lambda$ 鎖遺伝子周辺 10Mb を選んだ。インタクトな 22 番染色体を保持する DT40 細胞において、ヒトテロメアリピート配列を相同組換えにより LIF 遺伝子座に挿入すると、この部位に新たなテロメアが生成した短い染色体が得られる。続いて loxP 配列を相同組換えにより HCF2 遺伝子座に挿入した (DT40/hChr22)。次に SC20 保持 DT40 細胞と 22 番染色体保持 DT40 細胞とを融合して 2 本のヒト染色体断片を保持する DT40 融合細胞が作製された。この DT40 細胞に Cre 組換え酵素発現ベクターを導入すると、2 種の染色体断片の組換えによる転座が起こる。こうして得られた HAC ( $\lambda$ HAC) は前述の TC マウス作成と同様にしてマウス ES 細胞に導入され、HAC を持つキメラマウスが作成される。同じ染色体断片由来の 10Mb 領域を含む $\lambda$

HAC は 1 分裂あたり 99.8% という非常に高い安定性を示した。この安定性は基本ベクター SC20 と同等であり、染色体クロニングにより不安定な hCF 由来の染色体領域を安定化できることが示された。さらにキメラマウス血清においては、ヒト Ig 重鎖、 $\lambda$ 鎖タンパク質が共に検出されただけでなく、免疫したキメラマウスから抗原特異的なヒトモノクローナル抗体 (ヒト IgG およびヒト Ig $\lambda$  からなる) を分泌するハイブリドーマも取得されている。

### (5) HAC ウシ

以下のようにして $\lambda$ HAC 保持クローンウシ (ヒトポリクローナル抗体産生ウシ) も作製されている (Fig. 25)。

$\lambda$ HAC 含有 CHO 細胞から前述のマイクロセル融合法により、 $\lambda$ HAC をウシ繊維芽細胞に導入する。この $\lambda$ HAC 含有ウシ細胞の核をあらかじめ除核したウシ未受精卵へ核移植し、この再構築胚を発生させ、 $\lambda$ HAC ウシ胎児を作製する。ある程度成長させた後、この胎児から繊維芽細胞を大量に調製し、 $\lambda$ HAC ウシ細胞バンクを作製する。この細胞バンクから再度、未受精卵に核移植する作業を大規模に繰り返し、HAC 保持クローン牛を作製する。

このようにして作製されたクローンウシ胎児において HAC ベクター上のヒト抗体遺伝子の発現を調べた結果、内在性ウシ抗体遺伝子と同調して、脾臓などのリンパ組織特異的にヒト抗体重鎖 (IgH)・ $\lambda$ 軽鎖 (Ig $\lambda$ ) 遺伝子の発現が確認された。さらに、生まれたクローン仔ウシを詳細に調べた結果、 $\lambda$ HAC ベクターは 8 割以上のウシ体細胞 (繊維芽細胞および末梢血リンパ球) において安定に維持され、末梢血リンパ球においては、多種多様なヒト抗体重鎖 (IgH)・ $\lambda$ 軽鎖 (Ig $\lambda$ ) 遺伝子が機能的な組換えを起こし、発現していることが明らかになった。さらに、ヒト抗体はタンパク質としてウシ血液中に分泌されていることが ELISA (酵素免疫測定) 法およびウエスタンブロットング解析により証明された。

#### C. 3. 1. 4 糖鎖改変抗体

協和発酵で開発され、バイオワ社のコア技術になるフコース低減技術である。医薬品として開発されている抗体のほとんどは約 150kDa の IgG 型であり、H 鎖 L 鎖それぞれの二量体より構成され、Fc 部分の C<sub>H2</sub> 領域にアパラギン結合型のコンプレックス型糖鎖を持つ糖タンパク質である (Fig. 26)。抗体の糖鎖は共通のコア部分をもつが、末端の修飾が異なる 30 種類以上のオリゴ糖の混合物である。彼等はこの糖鎖の付け根に付いているフコースがないと後で詳述する抗体依存性細胞障害活性が動物レベルで 100 倍上昇することを見出した (Fig. 27)。

この技術は CHO 細胞で抗体を生産する時に、糖鎖にフコースが結合するための触媒として必要な

Fut8 という酵素遺伝子をノックアウトして発現しないようにすることで、FcγCの付かない抗体を作成するものである。

### C.3.1.5 その他

ヤギや植物にヒト抗体を生産する技術、ニワトリの卵白中にヒト抗体を蓄積する技術なども開発されている (Table 9)。

## C.3.2 抗体医薬の特徴

### C.3.2.1 キメラ抗体、ヒト化抗体

キメラ抗体、ヒト化抗体においてはマウス由来のアミノ酸配列の減少により、抗原性は著しく減弱し、実用的な抗体医薬の開発が可能となった。キメラ抗体、ヒト化抗体は現在開発中の抗体の約 50%強を占めている。しかしながら、依然抗原性の問題は残されている。キメラ抗体においてフレームワークを含む可変領域は、抗原性を残しており、多くの場合投与した患者の 3 割強に HACA (human anti-chimera antibody) が出現する。ヒト化抗体においても、キメラ抗体ほどではないにしろ場合によっては HAHA (human anti-human antibody) が患者に十数%の割合で出現する。この HAHA はマウス由来の CDR 配列に対するものであり、C 領域の多型性 (アロタイプ) や糖鎖によるものではない (Fig. 28)。このような HACA 及び HAHA 反応が強くなり、投与された抗体医薬の効果が減弱されるばかりではなく、アナフィラキシーショックが起こる可能性がある。また、ヒト化抗体技術は、それぞれのマウスモノクローナル抗体に対して個別にデザインし、遺伝子組換え体を作成する必要があると共に、そのデザインによってはマウスモノクローナル抗体に比べて親和性が低下する場合がある。

### C.3.2.2 ファージディスプレイヒト抗体

ファージディスプレイヒト抗体はヒト抗体の V 遺伝子をランダムに組み合わせさせて結合させ、それがそのまま *in vitro* での免疫系を再現するため、免疫学的な自己と非自己の選別過程を経ることがない。すなわち、いわゆる免疫学的に禁止クローンとよばれる自己抗体はもちろん、これまで血清抗体中やハイブリドーマ作製では見出すことのできなかった特異性を示す抗体が取得できる可能性がある。抗体は scFv あるいは Fab の形態で得られることから (Fig. 29)、医薬への応用を考えた場合、後述するように完全抗体分子型への変換が必要となる場合がある。しかし、scFv の完全抗体への変換は、ADCC などの抗体の Fc エフェクター機能を期待する場合には必須であるが、単にアンタゴニストとしての抗体の機能には、異なる 2 種の scFv において V<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> ドメインを相互に連結した二量体である Diabody や scFv でも十分である。さらにこれらの分子種は、分子量が小さいため組織浸潤性が高く、特に Diabody は体内での安定性が比較的高いとい

ったメリットもある。

得られた抗体はファージ上で g3p や g10p との融合タンパク質として発現していることから (Fig. 13)、単独の場合可溶性でかつ機能を有して発現できるとは限らない。特に scFv の場合には、不溶性粒子 (封入体) を形成したり、分泌発現しても scFv 単独で安定な構造を取らず、重合体を形成するなど、また Fab の場合には発現量が極めて少ない場合がある。医薬への応用に際しては、ADCC などの抗体の Fc エフェクターを期待するなど、より機能を高める必要がある場合、完全抗体分子型への変換が必要となる。scFv から Fab あるいは完全分子型の変換では 70%以上の確率で同様の特異性をもつ抗体分子が得られ K<sub>d</sub> 値は数倍~数十倍向上することが報告されているが報告例は少ない。その原因として宿主発現系も大腸菌から CHO などの動物細胞へと大きく変化することも考えられる。フェーズ III 臨床段階にあるファージディスプレイヒト抗体として D2E7 (TNF 抗体) がある。2001 年 12 月に行われた IBC 国際抗体会議で、リウマチ患者への臨床試験結果が発表されたが、そのなかで免疫抑制剤のメトトレキサートとの併用でも、三人の患者に HAHA の出現が報告された。これは CDR3 の部分に人工の配列を入れていることに加えて、PCR による変異が CDR 以外の部分にも入ることが原因かもしれない (Fig. 28)。いくつかの抗体によっては、Fab 化することによって、活性が消失するものもある。これらの scFv 抗体は、Diabody によって抗体活性が保持されており、単量体では活性が保持できず、Fab 化あるいは完全抗体への変換は困難である。

### C.3.2.3 トランスジェニックヒト抗体

ヒト抗体産生マウスを用いたヒトモノクローナル抗体の利点として、完全なヒト抗体分子が細胞融合法という比較的簡便な方法で得られることが一番の特徴である。目的の抗原で自由自在に強力な免疫をすることができ、目的のクローンに当たる確率は高く、親和性についても十分に高い抗体を選別できることが推定される。細胞融合後、通常は抗原に結合する抗体を選択するが、適当なアッセイ系があれば、多数のハイブリドーマクローンから目的とするクローンを直接選り出すことができる。また、ヒト抗体の特徴として強い結合性が得られやすいということも挙げられる。例えば、細胞膜上に存在するレセプターやウイルスなどに存在する、繰り返し構造をもつ抗原に対して強い結合性を得るには抗体が 2 価で結合することが望ましい。抗体の 2 つの部位が同じ抗原分子と反応できると、最初の部位が抗原と結合した場合、抗原分子が非常に近くにきているため、2 番目の部位は最初の部位よりはるかに速く反応し、見かけの親和力は Fab に比べて、2 価の IgG 分子では 10<sup>4</sup> 倍になると試算されている。また、ヒトに対して抗原性がより低い可能性もある。トランスジェニックヒト抗体はヒト由来のナイー

ブ抗体 IgM の V 領域と比べて同様な V 遺伝子の使われ方、同様な CDR3 領域のヌクレオチドの欠失、挿入の入り方が見られる。また、トランスジェニックヒト抗体 IgG の体細胞変異は、主に CDR あるいはその境界にみられ (Fig. 28)、アミノ酸レベルでは 0~7ヶ所程度 (重鎖 V 領域) である。従って、トランスジェニックヒト抗体はマウス-ヒトキメラ抗体、ヒト化抗体、ファージディスプレイヒト抗体に比べてよりヒト由来抗体に似ており、理論上はヒトに対して抗原性がより低いと考えられる。トランスジェニックヒト抗体の幾つかは、現在臨床試験段階 (フェーズ I、II) にある。未だ臨床例数が少ないこともあるが、現在のところ HAHA は報告されていない。

本法については次々と技術的改良が加えられ、多様性の高いヒト抗体をより高い作成効率で得られるようになった。

まだ基礎的な段階であるが、今後注目されるのは、ポリクローナルなヒト抗体を産生できる  $\lambda$ HAC 牛である。特に、細菌ウイルス感染症などの治療においてはモノクローナル抗体では限界があるため、ポリクローナル抗体医薬の必要性は高まる可能性がある (Fig. 30)。1種類のモノクローナル抗体に比べて、ポリクローナル抗体には多種の抗体が含まれるため、1つの抗原に結合できる抗体の数が多く、効果が大きくなる。抗原が特定できない場合に多種の抗体を投与すれば、何らかの抗体が抗原に結合する可能性もある。実際多くの病院では、感染症にかかった患者がすぐに何の感染症にかかったかわからない場合が多い。感染源の細菌やウイルスが特定できない場合、多種の抗体を含むポリクローナル抗体のほうが医師には使いやすい。現在は、ヒト血液から分離した  $\gamma$ グロブリン製剤が感染症の治療に使われている。この製剤は過去の病歴も様々な不特定多数の献血者に由来するため、抗原に結合する力にもばらつきが大きく、総じて効果は低い。従って、特定の有害な病原菌に対する力価の高いポリクローナル抗体は有用と考えられる。もう一点はウシの場合、乳に IgG が分泌されることから、製造コストを低くできる可能性があることである。現在の HAC 導入ウシでは内在性のウシ抗体遺伝子が圧倒的優位に発現しており、ヒト抗体量はいまだわずかである。商業化のためにはウシ抗体遺伝子を不活化するなどのさらなる技術開発が必要となるであろう。また、昨今の状況からウシ海綿状脳症 (BSE) の問題を回避するため、プリオンをノックアウトしたウシの製造も検討されている。

### C. 3. 3 抗体の生理活性機序

抗体は様々な作用機構を介して生理活性を発現する。そこで癌治療に応用されている抗体を例として代表的な作用機序をまとめた (Fig. 31)。

#### C. 3. 3. 1 腫瘍の生物活性に対する抗体の直接作用

アポトーシス誘導や成長因子に代表されるレセプターリガンド機構に対する干渉作用などを指し、現在臨床に応用されている抗体の多くは何らかのアポトーシス効果が確認されている。

#### C. 3. 3. 2 イデオタイプ反応を利用した腫瘍関連抗原に対する宿主免疫への感作

腫瘍の治療の立場からはすでに 1980 年の当初より、Miller や Levy らによる B 細胞リンパ腫においてリンパ腫表面の免疫グロブリンに対する抗イデオタイプ (Id) 抗体は最も腫瘍特異性の高い治療法として脚光を浴びた。抗体療法による最初の寛解例が、濾胞性リンパ腫に対するマウス抗 Id 抗体で 1981 年に報告されている。現在 B 細胞性腫瘍を産生する患者自身の抗 Id タンパク質をワクチンとして投与し、患者に Id 特異的な免疫反応を惹起させ寛解を維持する治療法の開発が進んでいる。

#### C. 3. 3. 3 抗体依存性細胞傷害活性 (complement-dependent cytotoxicity ; CDC)

近年、腫瘍細胞表面における補体制御因子 (CD55、CD59) の発現状態や標的抗原の raft への集簇性が CDC 効果に重要な役割を担っていることが報告され、再び注目を集めている。

#### C. 3. 3. 4 抗体依存性細胞性傷害活性 (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity ; ADCC)

IgG、IgE、IgA クラスの抗体の Fc 領域はそれぞれに特異的な Fc 受容体に結合し、Fc 受容体を持つ細胞を活性化したり、抗体の細胞間トランスポートに働く。特に、IgG クラス抗体が T 細胞、NK 細胞、好中球、マクロファージ上の Fc 受容体を介して、これらエフェクター細胞を活性化し、抗体の可変領域が結合した細胞を殺すことを ADCC とよぶ。現在、ADCC は抗体の腫瘍細胞傷害性で最も重要視されている。

最近、抗体の Fc 部分における糖鎖 (フコース) の状態により、ADCC 活性が 100 倍も増強するという報告がなされた (Fig. 27)。また、免疫グロブリン Fc に対するレセプターサブファミリー (Fc $\gamma$ R II a) 遺伝子多型によりエフェクター細胞と抗体の結合親和性に大差がみられ臨床効果を左右することが明らかにされている。エフェクター機能の重要性については、Fc レセプターのノックアウトマウスを用いた研究より、エフェクター機能の一つである ADCC が抗腫瘍効果のキーとなるメカニズムであることが明らかになった。また、患者の Fc $\gamma$  レセプターのゲノムタイプ解析による結果からも、抗 CD20 キメラ抗体の治療効果と ADCC に密接な関係があることが報告された。

#### C. 3. 3. 5 抗体と毒素あるいはアイソトープとの conjugate による細胞殺傷作用 (ミサイル療法)

ガン治療の開発過程で考案された手法である。ガンに特異的な結合活性を有するモノクローナル抗体にガン細胞を殺す抗ガン剤、毒素およびアイソトープを結合させて投与し、抗体がミサイルのようにガン細胞を集中的に攻撃し、ガンに特異的かつ効果的に治療する。

抗体医薬が細胞膜上分子のうち抗体結合後インターナリゼーション（細胞内取り込み）されやすい抗体は毒素や抗癌剤を標識し immunotoxin 療法に用いることができる (Fig. 32)。反対にインターナリゼーションされにくい抗体は強力な放射化合物を標識し、radioimmunoconjugate として用いることができる。

### C.3.4 抗体療法の現状

現在欧米を中心として様々な腫瘍関連抗原に対するモノクローナル抗体やその改変体の臨床試験が進行中であり、その結果が期待される。そのいくつかは欧米に続き日本でも認可され、その有用性が確立しつつある。以下に欧米で認可された代表的な抗体医薬を紹介する。

#### C.3.4.1 リツキシマブ

1991年、米国 IDEC 社は B リンパ球表面の分化抗原 CD20 に対するマウス型モノクローナル抗体 (IDEC-2B8) を作製した。その後、IDEC-2B8 の可変部領域とヒト免疫グロブリン (IgG1 $\kappa$ ) の定常領域とをマウス-ヒトキメラ型 CD20 モノクローナル抗体として遺伝子組換えで合成したのがリツキシマブである。

1993年に B 型細胞性非ホジキンリンパ腫治療薬の治験を開始し、1997年に米国 FDA の承認、1998年に欧州医薬品審査庁の承認を得た。現在 57 カ国で承認されている。日本では 1998年に希少疾病医薬品の指定を受け、2001年6月、「CD20陽性の低悪性度又は濾胞性 B 型細胞性非ホジキンリンパ腫」と「マントル細胞リンパ腫」の治療薬に承認され、発売となった。

(1)作用機序：悪性リンパ腫は、リンパ節もしくは臓器に腫瘍を形成し、組織学的にはホジキン病とノンホジキンリンパ腫 (NHL) に分類される。頻度は、ホジキン病が 10%、NHL が 90%で、NHL は 50~60歳代に多い。NHL の発症メカニズムとしては、抗原刺激によって増殖した B 細胞が、何らかの要因によって癌化して、B 細胞癌になると考えられている。癌化要因として、染色体の転座による Bcl-2 (細胞死誘導抑制) の活性化が挙げられる。

CD20 は Ca チャンネルとして B 細胞の活性化や分化、増殖にかかわっている。また、様々なチロシンキナーゼと結合しており、細胞内のタンパク質のリン酸化による細胞増殖を制御する経路への関与が考えられている。CD20 は正常 B 細胞および B 細胞腫瘍の細胞膜に発現している約 35kDa の親水

性リン酸化タンパク質であり、多数の細胞膜貫通ドメインを有する (Fig. 33)。静止期の B 細胞に比べ、活性化された B 細胞では発現量が約 4 倍に増加する。リツキシマブの作用機序として CD20 に結合し、シグナルを入れることにより、これらの経路の阻害作用による細胞周期の停止や Bcl-2 活性の抑制によるアポトーシスの誘導の他、補体依存性、抗体依存性細胞障害を介した経路が考えられている。

(2)腫瘍抑制効果：低悪性度又は濾胞性 B 型細胞性リンパ腫とマントル細胞リンパ腫への単独投与の結果は、奏効率は各々 60.7%と 46.2%と良好な結果である。本剤を再投与した症例の有効性 (奏効率) は初回より低いが 40%弱で、TTP (腫瘍増殖抑制期間) も少し短縮した。CHOP 療法 (シクロホスファミド、塩酸ドキシソルピシン、ビンクリスチン、プレドニゾンの多剤併用療法) との併用では、低悪性度および濾胞性 B 細胞リンパ腫を対象とした第 II 相試験で奏効率 95% (完全寛解 55%)、進行期中悪性度 B 細胞リンパ腫でも、奏効率 94% (完全寛解 61%) と高い有効性を示した。現在、CHOP 単独 vs CHOP+リツキシマブ併用の複数の第 III 相試験が進行中である。2001年の米国臨床癌学会での GELA グループの中間報告では、奏効率、event-free survival、overall survival いずれも優位に併用群が良好であった。この最終結果によっては近い将来非ホジキンリンパ腫の標準的治療が現在の CHOP 療法から CHOP+リツキシマブ併用療法に変更される可能性もある。また、リツキシマブは悪性リンパ腫のみならず、慢性関節リウマチ (rheumatoid arthritis : RA)、全身性エリテマトーデス (SLE) などの疾患に対しても臨床試験が行われている。

(3)副作用：初回投与時を中心に点滴中の発熱・悪寒・気管支攣縮などのアナフィラキシー様症状がみられることが多いが、一般に軽微である。

(4)その他：抗 CD20 抗体にアイソトープ (それぞれ  $^{90}\text{Y}$ 、 $^{131}\text{I}$ ) を結合させた薬剤である ibritumomab, tositumomab (国内未発売) も開発されている。抗 CD20 抗体により、これらのアイソトープが腫瘍細胞に集中的に運ばれ、近傍に  $\beta$  線による抗腫瘍効果をもたらす (Fig. 34)。

#### C.3.4.2 トラスツズマブ

この抗体の開発は 1990年に HER2 (human epidermal growth factor receptor type 2) 受容体の細胞外領域に親和性を持つマウスモノクローナル抗体 (4D5) 作成が発端となっている。その後、4D5 の抗原結合部位 (約 5%) のアミノ酸配列を、ヒト IgG1 骨格の抗原結合部位に遺伝子組換えで置き換えたヒトモノクローナル抗体がトラスツズマブであり、アメリカの Genentech 社により開発され



た。従って、約95%はヒトIgG1が残っているので、抗原特異性を保ちながら抗体自体の抗原性を低下させ半減期の延長を意図しているのが本剤の特徴である。

1992年より臨床治験を開始し、1998年に米国FDAで乳癌治療薬として認可された。日本では、オーファンドラッグ(希少疾病医薬品)指定を1999年に取り、2001年に発売され、抗癌剤との併用で抗癌剤単独の成績と比べて優れた成績をあげており、従来の抗癌剤との併用投与が行われている。

(1)作用機序: Her2遺伝子は細胞質側にチロシンキナーゼ活性領域を有する膜貫通型タンパク質(MW:180kDa)であり、EGFR(epidermal growth factor receptor)、ErbB-3、ErbB-4とともにEGFRファミリーを形成する。New-activating factor(NAF)、TGF- $\alpha$ 、AR(amphiregulin)などのリガンド結合によりEGFRファミリーはヘテロ二量体化、あるいはホモ二量体化され細胞内シグナル伝達される(Fig. 35)。乳癌、卵巣癌、子宮癌など様々な癌において約30%にHer2遺伝子の増幅、あるいはmRNAおよびタンパクの発現を認め(Fig. 36)、乳癌患者ではHer2/neu遺伝子の増幅あるいはタンパクの過剰発現を認める患者の予後は不良であると報告されている。これは癌細胞が作り出す増殖因子がHer2受容体に結合して、Her2からのリン酸化シグナルが過剰に伝わり、細胞分裂が促進されることによる。トラスツズマブはレセプターリガンドの結合を阻害するため、抗体自体の抗腫瘍効果が期待できる他、ADCC、CDC活性により癌細胞を殺す活性をもつ。これにより、効率的に癌細胞を除去できる。最近、Her2ヒト化抗体が癌の周囲にできる血管新生も阻害することが明らかにされている。また、*in vitro*の検討ではトラスツズマブ処理によりcyclin dependent kinase(CDK) inhibitorであるp27<sup>KIP1</sup>とRb関連タンパクであるp130の発現を誘導し、S期細胞を減少させるとの報告がある。

(2)腫瘍抑制効果: 治験第II相では、単独使用で11.6%の腫瘍抑制効果を示し、シスプラチン併用では24.3%に上昇した。第III相で、パクリタキセルの併用で41.3%、アントラサイクリン/シクロホスファミド併用で55.9%とそれぞれ抗腫瘍効果が上昇した。3種類の効果判定方法で比較したところ、病勢進行までの期間は、パクリタキセルの単独やトラスツズマブとの併用と比較すると、アントラサイクリンとシクロホスファミドに本抗体の併用により3倍以上延長した。奏効期間では、同様の期間延長効果が3倍以上であった。生存期間と生存率では、1年生存率は1.3倍程であるが、生存期間は1.5倍延長した。

なお、トラスツズマブはErbB-2の過剰発現がみられる症例においてのみ有効であり、抗体投与前に

責任癌遺伝子である、ErbB-2のプロファイリングを行い、治療適応を決定している。

(3)副作用: ①うっ血性心不全を発症し、その多くは一般的な心不全に対する治療に反応しているが、死亡例も報告されている。②投与中や投与開始後24時間にinfusion reaction(発熱、悪寒、嘔気、嘔吐、疼痛、頭痛、咳、めまい、発疹、無気力などの反応)が約40%に起きるが、程度は軽度～中等度のものが多い。また、抗癌剤との併用による白血球の減少、貧血、下痢、感染などの発現頻度が増加する傾向にあった抗癌剤、特にアントラサイクリンとの併用で発現頻度が高いが、単独投与でも認められている。さらに最近、トラスツズマブ投与に伴う有害事象として呼吸困難、低血圧、喘鳴、気管支攣縮、頻脈、酸素飽和度の低下、呼吸窮迫が報告された。まれではあるが、死亡例も出ており、特に肺転移による安静時呼吸困難を認める患者では注意が必要である。

#### C.3.4.3 インフリキシマブ

インフリキシマブは米国セントコア社により開発された遺伝子組換え型抗TNF- $\alpha$ マウス-ヒトキメラ抗体(cA2)であり、マウス由来25%(抗原認識領域)とヒト由来75%(定常部領域)から構成されている。近年、慢性関節リュウマチ(RA)やクローン病などの慢性炎症疾患の炎症病変形成において、TNF- $\alpha$ が中心的な役割を演じていることがわかってきた。そこで、TNF- $\alpha$ の作用を阻害する治療戦略が考えられるようになった(抗TNF- $\alpha$ 療法)。1998年インフリキシマブは米国でクローン病とRA治療薬としてFDAにより承認され、現在欧米など50カ国以上で承認されている。わが国においては2002年クローン病治療薬として承認され、2003年RAについても効能・効果が追加承認された。

(1)作用機序: クローン病は、小腸、大腸を中心に原因不明の炎症が持続し、腸管の潰瘍から始まり、狭窄・膿瘍、瘻孔をきたす疾患である。炎症に関与する物質にはTNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6、IL-8など十数種類が知られている。

また、RAは関節組織での滑膜細胞の異常増殖や滑液の貯留を伴い、最終的には関節における骨破壊を引き起こす関節炎である。その病態形成には、単球・マクロファージや滑膜組織から分泌されたIL-1、TNF- $\alpha$ 、IL-6などの炎症性サイトカインやIL-8、MIP-1 $\alpha$ 、RANTESのようなケモカイン、プロテアーゼなどが関与している(Fig. 37)。

近年、炎症組織でマクロファージなどから産生されるTNF- $\alpha$ がIL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8などの炎症性サイトカインを産生して「急性期免疫カスケード」を惹起することから、TNF- $\alpha$ を抑えることで下流のサイトカインを抑制できることが明らかになった。一方、臨床的にはクローン病患者の便中TNF- $\alpha$ の量

と疾患活動性が相関しているという報告や腸管局所において TNF- $\alpha$  を含めた炎症性サイトカインの産生が亢進している等の報告から、クローン病と TNF- $\alpha$  の関連性が示唆された。また、TNF- $\alpha$  は RA を引き起こす炎症性サイトカインの中で上流に位置すると考えられている。

インフリキシマブは可溶性の TNF- $\alpha$ 、膜結合型細胞表面 TNF- $\alpha$  のいずれにも結合能を有し、TNF- $\alpha$  受容体に結合した TNF- $\alpha$  にも結合することが確認されている (Fig. 38)。従って可溶性 TNF- $\alpha$  の中和による血管内皮細胞の接着分子 (E-selectin、VCAM-1、ICAM-1) 発現の down-regulate による、炎症病変形成抑制が考えられる。また、TNF- $\alpha$  産生細胞の細胞膜上に存在する膜型 TNF- $\alpha$  分子への作用による炎症性サイトカイン産生を抑制する機序も考えられている。またこれら以外に ADCC 活性および CDC 活性などにより、TNF- $\alpha$  産生細胞を傷害し、TNF- $\alpha$  の産生自体の低下作用も考えられる。

(2) クローン病への治療効果：クローン病の三つの評価項目 (CAI、IBDQ、CRP) で、5mg/kg、10mg/kg とプラセボを比較した。①クローン病活性指数 (CAI) では、2 週後で 5mg/kg も 10mg/kg も有意の差でプラセボを凌駕したが、量の増加や投与期間による大きな差はあまりない。②炎症の指数 (IBDQ) でも、4 週で比較して 5mg/kg は有意の差で効果を示した。③C-反応性タンパク (CRP) でも、5mg/kg で充分の効果を 2 週間後で示したが、4 週後では少し「戻り現象」が見られた。クローン病の瘻孔数と瘻孔の閉鎖数で比較しても、5mg/kg で充分の効果が得られた。

(3) RA への治療効果：インフリキシマブ投与の 102 週 (約 2 年) 後の時点で、評価項目を ACR 20% の比率 (改善度) で比較した結果で良好な改善が得られた。他の評価項目でも、①X 線スコア (増加抑制度)、②HAQ スコア (障害指標)、③SF-36 スコア (QOL 評価) で併用群 (特に、インフリキシマブ 10mg/kg を 4 週毎に投与) で優れていた。

(4) メトトレキサート併用療法：インフリキシマブ単独による単回投与、複数回投与の結果で明らかになった問題点として、①中止後の再燃、②中和抗体の産生が指摘された。インフリキシマブに対する中和抗体の出現頻度は約 20~40% と報告されているが、反復によりその頻度は増加する。しかし、インフリキシマブをメトトレキサートに追加して投与すると、中和抗体の検出率は低下し、効果が強力かつ長く維持できることがわかった。

(5) 副作用：投与後 1~2 時間で起こる急性反応には掻痒感、蕁麻疹などの皮膚症状、胸痛、呼吸困難などの心肺症状があり、それぞれ 1% 程度ほど報告

されている。2~4 年後の再投与反応は、より重篤で、10% ほどで発熱、筋肉痛、関節痛などが出現したと報告されている。これ以外に、重篤な感染症、自己抗体の誘導や SLE 様症状の出現、悪性腫瘍/リンパ増殖性疾患などが報告されている。さらにカリニ肺炎、真菌症などの細胞内寄生感染症が報告されている。特に結核は肺外結核などの重症型も多く、一般人口の 6 倍程度の発生頻度とされる。これは新たな結核の感染ではなく、既感染、不顕性感染の再活性化と考えられる。

#### C.3.4.4 バシリキシマブ

1986 年、英国ロイヤルフリーホスピタルにおいて活性化 T 細胞に発現する IL-2 レセプター  $\alpha$  鎖 (CD25) に対するモノクローナル抗体 (RFT5) 分泌細胞株が樹立された。その後、ノバルティス・ファーマ社は遺伝子組換え技術を応用して抗体の可変部位のみにマウス由来の抗体を使用し、それ以外の抗体の基本部分はヒト由来としたマウス-ヒトキメラ型 CD25 モノクローナル抗体を作成した。1998 年、米国および欧州にて急性免疫拒絶剤として承認された。日本においては 2002 年に承認された。

(1) 作用機序：IL-2 は T 細胞および B 細胞の細胞傷害性を増強し、LAK 細胞を誘導する。腎移植時における免疫拒絶には IL-2 によるこれら細胞の活性化が関与している。バシリキシマブは IL-2 レセプター  $\alpha$  鎖に特異的に結合し、IL-2 のレセプターへの結合を阻止し、シグナル伝達をブロックする。その結果、免疫細胞の活性化が抑制され、急性拒絶反応の発現率が低下する。

(2) 急性拒絶反応抑制効果：バシリキシマブは、2 回投与 (Day 0、4) のみで IL-2 レセプターを 1 カ月以上ブロックする。バシリキシマブは、シクロスポリン、ステロイドと併用することにより、急性拒絶反応の発現をプラセボ群に比べ 30% 以上減少させる。また、その効果は 12 ヶ月においても持続する。

(3) 副作用：国内臨床試験 (31 例) における副作用の報告は 25 例 (80.6%) であった。主なものは発熱 9 例 (29.0%)、サイトメガロウイルス感染 7 例 (22.6%)、鼻咽頭炎 4 例 (12.9%) であった。外国における第 III 相臨床試験 (シクロスポリン及び副腎皮質ホルモン剤に加え本剤又はプラセボを投与した二重盲検試験) において認められた、主な副作用は尿路感染 37 例 (10.2%) ウイルス感染 23 例 (6.3%)、単純疱疹 14 例 (3.9%)、肺炎 8 例 (2.2%)、高カリウム、便秘、発熱各 7 例 (1.9%) であった。

#### C.3.4.5 パリビズマブ

米国メディムン社で開発された抗 RS ウイル

スポリクローナル抗体RSV-IGIV(本邦未承認)は、RSウイルス感染による重篤な下気道疾患の予防効果が認められ、1996年に米国FDAより承認を取得した。なお、RSウイルス(Respiratory Syncytial Virus:以下RSV)とはパラミクソウイルス科に属するRNAウイルスで、主に1歳未満の乳児における肺炎や細気管支炎等の下気道疾患の主要な原因ウイルスである。しかしながら、血液製剤であるため感染性病原体による汚染の可能性があること、また原料供給不安定による製品不足の可能性があり、点滴静注のため輸液量が多くなること等の問題点があり、使用においては種々の制限があることが指摘されていた。そこでメディムン社ではRSV-IGIVのこれらの問題点を解決するため、新しい抗体の開発に着手し、その結果開発されたのが、RSウイルスに対して特異的なヒト化モノクローナル抗体パリビズマブである。米国において「RSウイルス感染がハイリスクとなる患児におけるRSウイルスによる重症な下気道疾患の予防」を適応症として1998年に承認された。これまでに、米国および欧州を含む46ヶ国で承認を取得し、日本においては2002年承認された。

(1) 作用機序：パリビズマブはRSVのFタンパクの抗原部位A領域に特異的に結合するヒト化モノクローナル抗体である。本剤はRSVが宿主細胞に侵入する際に重要な役割を果たすFタンパクに結合してウイルスの感染力を中和し、ウイルスの複製および増殖を抑制する。

(2) RSV感染予防効果：パリビズマブは海外で実施された第Ⅲ相二重盲検比較試験において、ハイリスク患児(早産児、BPDを有する児)のRSV感染による入院率をプラセボ群に比べて約55%低下させることが認められた。

(3) 副作用：海外の第Ⅱ相および第Ⅲ相臨床試験(総症例数1,222例)では、主な副作用として注射部位反応、発熱、神経過敏等が認められたが、多くは軽度であり、本剤投与群とプラセボ群との副作用発現率はほぼ同等であった。国内における早産または気管支異形成症(BPD)の新生児、乳児および幼児31例を対象にした第Ⅰ/Ⅱ相試験においては、副作用は認められなかった。

#### C.3.4.6 アダリムマブ

アダリムマブは、アボット社により開発されたファージディスプレイライブラリー法を用いて作られた完全ヒト型TNF- $\alpha$ モノクローナル抗体である。抗体クラスはIgG1である。具体的には、ヒト型抗TNF- $\alpha$ モノクローナル抗体のH鎖(重鎖)およびL鎖(軽鎖)の遺伝子を組み込んだ発現ベクターをチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞に遺伝子導入し、無血清培地で培養することにより本抗体

を得ている。RAに対して2002年12月に米国で認可された。現在、わが国では臨床第Ⅱ相試験が行われている。作用機序、効能、副作用については抗ヒトTNF- $\alpha$ ヒト化抗体であるインフリキシマブと同様である。しかし、本抗体が完全ヒト型であり、しかも皮下注射であることから、インフリキシマブと比較すると、アナフィラキシーをはじめとする投与時反応(infusion reaction)が起こる頻度はきわめて低い。

#### C.3.4.7 ゲムツズマブオゾガマイシン

ゲムツズマブオゾガマイシン(販売名：マイロタグ)はセロテック社により開発されたヒト化抗CD33抗体にN-acetyl- $\gamma$  calicheamicin demethyl hydrazide (Nac- $\gamma$  calicheamicin DMH)をリンカーを介して結合させた抗体療法剤である。2000年に米国において急性骨髄性リンパ性白血病を適応症として認可された。現在日本では承認申請中である。

(1) 作用機序：CD33抗原は67kDaの糖タンパク質である。シアル酸依存性の接着タンパク質としての機能を有していると考えられるが、詳細な機能は解明されていない。顆粒球系、単球系と巨核球前駆細胞に発現を認めるが、正常な多機能性幹細胞、リンパ系細胞および非造血組織には発現が認められない。AML症例の90%以上に発現しており、発現量は10,000~20,000コピー/細胞である。また、CD33には、抗体が結合すると速やかに細胞内にインターナライズされるという特徴がある。ヒト化抗CD33抗体に結合させるcalicheamicinは米国Lederle社により土壌菌である*Micromonospora echinospora* ssp.*calichensis*から単離された抗腫瘍性抗生物質である。従って、ゲムツズマブオゾガマイシンの抗体部分が白血病細胞のCD33と結合すると、細胞内に取り込まれ、白血病細胞のライソゾームの消化酵素によって抗癌効果を持ったcalicheamicin部分が遊離される(Fig. 39)。その際calicheamicinは活性なラジカル体となってDNAと結合し、これを切断し、細胞傷害性を発揮する。

(2) 急性白血病治療効果：CD33陽性急性骨髄性白血病の初回再燃症例の142例について、ゲムツズマブオゾガマイシンは9mg/m<sup>2</sup>、14日間隔で2回投与され、2回目投与の後28日間経過観察が行われた。なお、投与前に副作用を軽減する目的でアセトアミノフェン650~1000mgとジフェンヒドラミン50mgを内服した。末梢血から白血病細胞(プラスT)が消失する完全寛解したのは約30%(42/142)で、再燃までの平均期間は60日であった。142例の平均生存期間は5.9ヶ月で、142例中56例は臨床試験の期間中生存した。

(3) 副作用：急性の副作用として悪寒(62%)、発熱

(61%)、吐気(38%)、頭痛(12%)、血圧低下(11%)、血圧上昇(6%)、低酸素血症(6%)、呼吸困難(4%)、血糖上昇(2%)が発症した。骨髄抑制として Grade3-4 の好中球減少(98%)、Grade3-4 の血小板減少(98%)、Grade3-4 の貧血(47%)が発症した。日和見感染を含めて Grade3-4 の感染症(28%)が発症した。Grade3-4 の出血(15%)が発症した。口内炎や胃炎(35%)が発症した。Grade3-4 の高ビリルビン血症(23%)が発症した。

### C.3.5 抗体医薬の展望

当面はヒト化抗体、キメラ抗体が主流となると思われるが、抗原性の観点から、将来的にはファージディスプレイ技術、トランスジェニック技術を用いた完全ヒト抗体がそれにとって代わるかもしれない。

ヒトゲノム配列がすべて明らかになり、新規な遺伝子の機能が続々と解明される時代になり、抗体のターゲットとなる遺伝子も急速に増加しつつある。また、抗体医薬の標的として既知の抗原も含め、より有効性の高い治療のターゲットとなりうるものを見つけ出す手法として、マイクロアレイなどを用いた遺伝子発現プロファイルの解析やプロテオーム解析などを用いて、従来に比べより大規模に網羅することが可能となっている。今後さらに進化するであろう免疫学、分子生物学、遺伝子工学的手法を用いた創薬研究により、標的細胞に対する高い生物学的活性と特異性を持つ治療薬としての抗体が得られることが期待される。

### C.3.6 抗体医薬の今後の課題

抗体療法は大きな発展をとげ、幾つかについては承認され、開発中のものは多数存在する。しかしながら、今後克服すべき点として組織移行、細胞内移行、コスト、トランスレーショナルリサーチの確立などの問題が残されている。

(1) 組織移行：抗体は静脈内投与後の血中半減期が通常1~2週間と長く、持続性薬剤として使える利点がある。しかし、抗体は分子量10万を超える巨大タンパク質であるため、血中から組織への移行性が非常に悪い。これが患者に大量投与しなければいけない原因となっている。その解決策としてファージディスプレイなどの方法を用いて分子のサイズを小さくし、移行性を増大することが考えられ、現在盛んに試みられている。しかしながら、低分子化によりエフェクター機能は失われ、抗体本来の長所である長い血中半減期やシンプルな代謝・排出の機構は失われる可能性がある。両者の特徴をどのように両立させていくか、ケースバイケースの対応も含め今後検討していく必要がある。

(2) 細胞内移行：現状の抗体医薬の標的分子は、血清中の可溶性タンパク質もしくは細胞表面のタン

パク質である。しかし、ゲノム解析によって明らかになっている疾患関連標的遺伝子産物には、むしろシグナル伝達タンパク質や転写因子など、細胞内タンパク質が多く含まれる。その意味では細胞内抗体も、新しい抗体医薬品の開発領域として今後重要になってくると考えられる。遺伝子治療に使われるウイルスベクターやリボソームを用いれば、細胞内タンパク質に対する抗体遺伝子あるいは抗体そのものを細胞内に送り込み、関連する遺伝子を機能的にノックアウトすることでガンやエイズなどの感染症の治療にも応用できる。例えば、ガン治療を目標に、EGFR、RAS、CDKを、HIVではCCR5、TATなどを標的にした研究がなされている。

(3) コスト：経済面の観点では抗体の生産をより安価にすることも重要な課題である。一般に抗体医薬品の投与量は数mg~数百mgにまで及んでいる。細胞株の改変など工夫がなされているが、現在の細胞培養系で大幅なコストダウンを図ることは限界にきている。前述したキリンビールのHAC牛、Genzyme社のヤギなど哺乳動物の乳汁に抗体を分泌させ

る技術、TranXenoGen社などはニワトリ卵白中に抗体を産生させる技術を開発している。そのほか、様々な企業が大腸菌、酵母、タバコやトウモロコシなど植物を利用した抗体産生技術を開発している。今後適応すべき抗体の種類を見極めて応用を図ることが重要である。また、植物や動物を生産系として用いる場合は安全性、信頼性の観点に留意して可否を判断することはいうまでもない。

(4) トランスレーショナルリサーチ：現在臨床応用がなされている抗体医薬の成功には抗体改良、in vitroあるいは動物実験という莫大な基礎研究の取り組みが不可欠であった。一方では基礎研究で興味深い研究であっても、ヒトへの応用を通じて治療に活用できなければ、あくまで基礎研究で終わってしまう。臨床応用につながるシーズを基礎研究から得て、それを臨床応用につなげるトランスレーショナルリサーチが特に抗体治療薬の開発には不可欠であり、今後そのあり方を模索していく必要がある。

ハイブリドーマによるモノクローナル抗体作成技術が開発された後四半世紀を経た現在、遺伝子工学的手法の発展により、ようやくモノクローナル抗体を用いた抗体療法の有用性は確立しつつある。特にガンにおいては抗体療法がきわめて有用な治療法の一つとして確立されることは間違いないと考えられる。今後さらなる学問の進歩および技術革新により、さらに有用で安価な治療用抗体が開発されると考えられる。今後の抗体医薬のさらなる発展に期待したい。

#### C. 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

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、様々な疾患の治療を目的として直接投与する医療（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、心筋梗塞などの致命的な疾患、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。

細胞治療薬の開発が世界的な広がりを見せているが、承認にまで至っている製品はそれほど多くない。また、わが国においてもいくつかの製品が治験前の確認申請の手続きが出され、審査の結果、薬事・食品衛生審議会の確認を受けて、治験に入っているが、承認にまで至った製品は一つだけである。一方で、大学や病院等で多岐にわたる細胞治療の臨床研究が行われているが、このような臨床研究の成果はなかなか細胞治療薬の開発に結びついてはいない。その一つの要因として、このような臨床研究が治療薬開発を視野に入れた研究となっていないことや、企業が臨床研究の成果を細胞治療薬開発につなげようとする際にどのようなデータが治験申請や、さらには承認申請に必要なのかが十分に理解されていないことも挙げられる。

本研究では、FDA における細胞治療薬（細胞組織加工医薬品・医療用具）の新薬治験の「化学、製造及び品質管理」に基づいた審査における指針と審査報告書のフォーマットについて詳細な解析を行った。FDA の細胞治療 IND ガイドライン案は、審査官が体細胞治療薬の新薬治験申請を審査する際に、「化学、製造及び品質管理」の観点からどのような点を審査すべきか、申請者にどのようなデータを提出させ、また審査のどのような結果を審査報告書に記載すべきか、さらには治験開始までに、あるいは治験のどの段階までにどのようなデータの提出が必要かについて書かれている。従って、審査官への指針書との書き方をしているが、体細胞治療薬の新薬治験審査を行う際に、必要なデータ、規格試験の設定など、その品質、安全性の確保に加えて、治験プロトコルデザインをどのように設定すべきかについても書かれており、申請者に必要な情報が盛り込まれている。このガイダンスの詳細を調査することは、FDA における体細胞治療薬の治験申

請に当たっての、製造方法を含めた安全対策、品質確保のための施策を理解するのに非常に有用である。

以下に、FDA の細胞治療 IND ガイドライン案の調査結果を示す。

##### C. 4.1 審査報告書に記載すべき行政情報

最初に、審査管理官がヒト体細胞治療薬の新薬治験申請の「化学、製造及び品質管理」審査に当たっての求められる事項や、審査報告書への記載事項、申請者に明らかにさせるべき事項や対応の期限等申請者へ通知しておくべき事項等を明らかにしておくことが細胞治療 IND ガイドラインの目的であることが記載されている。細胞治療 IND ガイドラインは、基本的には現在までに FDA から出されている細胞治療薬や IND に関するガイドライン<sup>46-50</sup>を参照することとされており、細胞治療薬特有の問題点等を抽出したものといえる。さらに、細胞治療 IND ガイドラインには審査報告書に記載すべき行政上の必要事項についても述べられている。

##### C. 4.2 製造工程及び製品に関する情報

審査官は調査報告書の中に細胞治療用医薬品をどこでどのように製造するかについて記載しておく必要があるとされている。また、用いる細胞、細胞バンクシステム、試薬、添加剤等の細胞治療用医薬品の製造に用いられる全ての要素や試薬等についての記録も必要とされている。さらに、製造における全ての工程の記載やその妥当性を評価しておく必要性が述べられている。製造工程欄には、細胞や組織をどのように採取し加工するのか、細胞の純化法や調製法、さらには最終製品での製剤化も含まれる。審査に当たっては、「ヒト体細胞治療及び遺伝子治療に関する指針」<sup>46</sup>、「新薬の第1相治験申請の内容とその書式」<sup>47</sup>、「バイオテクノロジー応用医薬品を含む新薬の第2相及び第3相治験申請；化学、製造方法、および治験コントロールの内容と書式」<sup>48</sup>の通知案を参照することとされている。さらに、審査報告書を提出する前に、FDA が発出している全ての関連通知や基準を参考にするべきとされている。

###### C. 4.2.1 製造工程—原料や試薬等

審査官は細胞組織利用医薬品の製造に用いる全ての細胞や試薬等について審査報告書に記載することが求められている。また、細胞や試薬をどのような原材料から得たのかについて記載するとともに、細胞や試薬等の受け入れ試験についても概要を作成しておくことが求められている。

###### (1) 細胞

###### a. 細胞の由来としての同種や自己の違い

審査報告書には以下の点について記載しておく必要があるとされている。

- 細胞原料：組織や細胞の種類（例えば、結腸細胞、血液細胞、神経細胞、T細胞）。
- 細胞誘導の方法：in vivo でドナー細胞を誘導したり、活性化するような方法を用いているかどうか。
- 細胞の採取方法：細胞を採取する方法（手術を行うのか白血球分取（可能であれば用いる機器についても）などの方法を用いるのか）や採取を行う施設の名前と所在地。
- ドナースクリーニングの方法：ドナースクリーニング法の十分な安全性を担保できるか評価するとともに、その試験方法について記載すべきとされている。FDA ではこれに関連して、「クラスII特別規制ガイダンス文書：ヒト硬膜」<sup>49)</sup>、「クロイツフェルトヤコブ病及びヒト細胞組織由来製品における変異型クロイツフェルトヤコブ病のリスク低減化のための防御手段」<sup>50)</sup>、「ヒト細胞組織利用医薬品のドナー適正」<sup>51)</sup>についてのガイドライン案がすでに出されており、これらを参照することが求められている。最終的にドナースクリーニング法を設定する場合には、IND に記載されたドナーの品質基準が新しいこれらのガイダンスに適合しているか、あるいはその要求されている点に答えられているかを評価することが求められている。

#### ①自己由来細胞を用いる場合

ドナーが特別な感染性因子（例えばヒト免疫不全ウイルス、サイトメガロウイルス）の検査やドナースクリーニングが行われていない場合、製品の製造に用いられる培養工程が、治療を受ける患者以外の人に対してウイルスあるいは他の感染性因子の増幅や拡散を引き起こさないか考察するべきとされている。

#### ②同種細胞を用いる場合

HIV-1、HIV-2、HBV（表面抗原及びコア抗原に対して）、HCV、ヒトT細胞白血病ウイルス1型及び2型（HTLV-1、HTLV-2）、CMV、EBV、あるいは適切な他のウイルス等の感染性因子に関するドナースクリーニングと試験についての関連情報の記載が求められている。これらの試験においては、FDA が承認あるいは許可した試験試薬キットを用いて行うべきとされている。またドナーに関する血清学的あるいは診断履歴、医療履歴（病歴）等についても報告書に記載するべきとされている。必要に応じて遺伝的多型性や主要組織適合抗原の一致についてデータを求めることも考慮すべきとされている。臍帯血や他の分娩由来原料を用いる場合はドナーの母親での試験を行うことが求められている。ドナー細胞の臨床履歴や試験に関連する全ての事項について臨床審査官と議論をすべきとされている。

#### b. 細胞バンクシステム

フィーダー細胞として動物由来細胞を用いる場合には、異種移植に関する2つのガイドライン<sup>54,55)</sup>を参考にするように要請されている。

審査官は製品の製造に用いる細胞バンクシステムについて、その履歴、どのような原料から得たのか、どのような誘導法を用いたのか、特性解析結果、各マスターセルバンク（MCB）やワーキングセルバンク（WCB）の試験法と試験のタイミング等に関する情報を明らかにしておくべきとされている。これらの審査に当たっての情報として、「生物薬品の製造に用いられる細胞ラインの特性解析に当たって考慮すべきこと」<sup>52)</sup>やICHのQ5D文書「生物薬品（バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品）製造用細胞基剤の由来、調製及び特性解析」<sup>53)</sup>についても参考にすべきとしている。自己由来細胞製品などのように細胞バンクを用いない場合には、次のような試験の適用は難しいかもしれないとしている。

#### マスターセルバンク（MCB）

審査官は安全性、同一性、純度、安定性を確保するための試験法を含むMCBの特性解析についてその妥当性を評価するべきとされている。また次のような事項について試験が適切に行われているかについて明らかにさせるべきとされている。

(ア) 製品の微生物汚染についての事項、この中には無菌性試験、マイコプラズマ否定試験、in vivo、in vitro ウイルス試験も含まれる。

(イ) 特定の感染性因子の汚染がないことの確認。自己細胞以外のヒト由来細胞はCMV、HIV-1と2、HTLV-1と2、RBV、HBV、HCVなどについて試験を行うべきである。牛やブタ由来の添加因子（血清やトリプシン等の血清由来成分）による牛やブタ由来の感染性因子が細胞に汚染されていないか試験を行い、試験結果に基づいて評価。

(ウ) 細胞の生理的あるいは生化学的的特性解析を通じた目的細胞の同定のための試験方法を含めた細胞の同一性確認試験。

(エ) バンク細胞の純度：これには混入している目的外細胞の同定や混入比率も含まれる。

(オ) 細胞の活性（活性化リンパ球、ドーパミン分泌能、インスリン分泌能など）や細胞の機能成熟（網状細胞など）。

(カ) 審査官は、可能であれば製品の安全性において重要な他の工程についても記載しておくこと。これには、次のような項目が含まれる。

①全ての培地の詳細や製造に用いる試薬や添加剤を含めた培養条件。また試薬等の保証書のコピーを含む。

②細胞濃度、保存したバイアル数、保存温度、細胞バンクを保存している施設の所在など、関連する情報を含めたMCBの凍結方法、保存方法、解凍方法。

③凍結保存後の継代数を重ねた時の MCB の遺伝的あるいは表現形質の安定性や細胞の生存率に関する情報。

## (2) 試薬

審査官は製造に用いる全ての試薬をリストアップし記載することが求められている。FDA の細胞治療 IND ガイドライン案では、リストアップすべき試薬として、細胞の増幅、分化、選択、精製、さらには他の重要な製造工程において必須な要素であるが、最終製品には含まれないものとされている。例えば、胎児仔牛血清、トリプシン、成長因子、サイトカイン、モノクローナル抗体、抗生物質、細胞分離装置、培地、さらには培地成分があげられている。これらの試薬は、最終製品の安全性、力価、純度に影響するものであり、特に感染性因子の迷入には特段の注意を払う必要があると考えられている。

### a. 製造に用いる試薬の一覧

審査報告書の中には培養液に添加するものを含め製品の製造中に用いる全ての試薬をリストアップすることが求められている。用いる試薬について以下の点を明らかにしておく必要があるとされている。

- ① 試薬の使用時の濃度。
- ② 試薬供給業者/生産者。
- ③ 試薬の原料：用いる試薬の原料がヒト由来である場合には、製品の製造や調製に用いる全てのロットの安全性が保証できるような適切な方策がとられているかを明らかにしておく必要がある。全ての動物由来試薬に関しては、由来となる生物の種類、その供給者/生産者、それらを得た国、どのような製法で作られているのかについてのデータベースを提出することを求めるべきとされている。ブタ由来試薬を用いる場合は、ブタ原料での試験結果に基づいて化学、製造及び品質管理基準に則りブタパルボウイルスの混入がないことを明らかにすべきとされている。反芻動物由来原料を用いる場合は、BSE 発生国あるいは BSE リスクの高い国由来のものでないことを明らかにしておくことが必要とされている。もし、申請者が BSE リスクの高い国由来の原材料を用いようとしている場合には、他の原材料由来のものを用いることを求めるべきとされている。BSE 問題に関する臨床審査官の意見や、FDA の BSE に関するページを参照するべきとされている。
- ④ 試薬の品質：用いる各試薬等は FDA が承認したものであるかどうか審査報告書で明らかにするよう求めている。もし試薬等が生物薬品、医薬品あるいは医療用具として規制を受けるものである場合には、専門の審査官との相談審査を行う必要性を考慮すべきとされている。相談審査の手続きに関しては、「細胞組織利用医薬品と同時に用いるもの」に関する項を参考にすべきとしている。また、「ヒ

ト治療用モノクローナル抗体の製造と試験法においての考慮事項」<sup>56</sup>に関する指針を参考にすることも必要とされている。

⑤ 「化学、製造及び品質管理」あるいは「相互参照文書」：もし申請者が製造工程の一部で、FDA で承認されていない研究用レベルの試薬を使用しようとしている場合は、その試薬の使用に当たってその原材料の品質や安全性に関する情報を「化学、製造及び品質管理文書」として提出することが必要とされている。あるいは、試薬製造業者規制ファイルが FDA に提出されている場合には、申請者からの「相互参照文書」を治験申請として提出することも可能とされている。「化学、製造及び品質管理文書」の作成では、行われた試験が妥当かどうか、また試薬に関する試験に不十分な点がないかを評価しておくことが求められている。「相互参照文書」の作成では、規制ファイルコードが含まれている必要があり、また何らかの安全上において問題になる点や特別な配慮を払うべき点がないかについて相談審査を行っておく必要性も考慮すべきとしている。

### b. 品質管理プログラム

用いる試薬が FDA の承認を得ていないものである場合には、試薬の安全性や品質確保のための追加試験が必要となる。安全性試験（無菌性、エンドトキシン、マイコプラズマ、ウイルス等）、機能解析、純度、有害物質（残存溶媒試験）の否定試験を含む品質管理プログラムが適切に行われているかを審査報告書に明記すべきとされている。どの程度の試験を行うべきかについては製造工程において対象となる試薬がどこで使用されるかによるとされている。

### c. 最終製品における試薬の残存性の確認

審査報告書には最終製品への試薬等の残存量を検出する規格試験を記載すべきとしている。用いる試薬に既知の毒性が知られている場合には、治験に当たって、最終製品でその試薬が十分に除去されていることを示すデータが申請者から提出されているかを明確にすることが必要とされている。

### d. 他の問題点

ペーラクタム系の抗生物質（例えば、ペニシリン、セファロスポリンやこれらの誘導体）が製造に用いられている場合には、適切な除去基準の設定や投与する患者への問診も含めて、臨床審査官と相談することが必要とされている。あるいは、他の抗生物質に変更を要求することも考慮すべきとされている。

## (3) 複合製品

この審査官向け指針の目的とする複合製品とは、ヒト体細胞利用医薬品と CBER の所管するところの医薬品や医療用具とを組み合わせた最終製品を

指すとされている。組み合わせる医薬品や医療用具はFDAの市販の承認を受けたものもあるかもしれないし（新薬承認申請（NDA）、市販前承認申請（PMA）、あるいは一定の要件を満たした医療用具の市販の届け（510(k)、治験中（新薬治験申請（IND）、医療用具治験届け（IDE））のものや、初めてヒトへの治験を行うことになるものも想定される。審査官は、審査管理官ないしは申請者と協議して使用される医薬品や医療用具が承認申請上どの段階に当たるものなのかを分類しておくことが求められている。もし当該医薬品や医療用具が承認されているものである場合には、審査報告書にそのことを記載しておくべきとされている。殆どのケースで、CDERや医療用具・放射線医薬品審査センター（CDRH）との相談あるいは共同審査が必要となると考えられる。そのようなケースでは、すでに承認を受けている医薬品や医療用具を用いる場合でも同様のことが必要とされている。なぜならば、当該製品にこれらの医薬品や医療用具を用いる場合、新たな目的、新たな用量、あるいは異なる投与方法であるとか、医療用具の場合には新たな使用方法、使用目的となるなど、承認されていない目的に用いることが多いと想定されているためである。

もし、複合製品の医薬品成分や医療用具の部品がFDAにすでに承認申請が出されている場合には（例えば、治験申請、医療用具治験届けあるいはマスターファイルとして）、複合製品の申請者は相互参照ファイルを提出することができる。相互参照ファイルは、複合製品の成分あるいは部品として医薬品や医療用具を用いる時の安全性を担保するために、「化学、製造及び品質管理基準」に従って、使用される成分や部品を審査するCBERの許可を与えるものである。審査官は審査報告書の中に当該製品のなかの医薬品成分あるいは医療用具の部品に関する相互参照ファイルが存在することを明記し、そのファイルに含まれるべき必要な情報の妥当性を明らかにしておくことが必要とされている。また、審査官は、協議審査官あるいは共同審査官に、その審査に役立つ相互参照ファイルに書かれている情報を提供することが求められている。

協議審査官あるいは共同審査官への要請は、「審査センター間での協議審査及び共同審査手順」<sup>57</sup>に記載されている標準審査手順及びその考え方に書かれていることに従って行われるべきとされている。

#### a. 医療用具の審査

審査官は医療用具・放射線医薬品センターの審査官に医療用具材料が複合製品の中でどのように使われているのか、適切な生物学的同等性あるいは一般的な医療用具としての試験が充分に行われているか、用いる基材やその基材を動かすためのソフトウェアの試験が適切に行われているかについて意見を求めるべきとされている。審査官は、医療用具・放射線医薬品センターの医療用具材料に関する

審査結果を提出する報告書に沿って、特に重要な問題点を申請者に伝えなければならないとされている。審査官は、複合製品の医療用具材料に関する情報として医療用具の名前、製造者やどこから得たか、使用目的、どのような申請段階にある製品か、さらには簡単な医療用具の説明を記載しておくことが求められている。

#### b. 医薬品成分

医薬品成分が含まれる製品の相談審査や共同審査では、審査官はその複合製品の中で医薬品成分がどのように使われているのか、また申請書のどこに情報があるかを伝える必要があるとされている。用いられている医薬品成分が承認されているか申請中のものでも、新規の投与方法で用いていた、異なる用量、あるいは新しい薬効を目指している場合がある。審査官は医薬品審査センターの相談担当審査官にどのようにその医薬品成分が最終製品の中で使われるのか、製造方法の評価、医薬品原液あるいは製剤として適切な試験結果が得られているかを確認してもらうようにすべきとされている。医薬品成分に関連する審査官の基本的情報についても審査報告書に記載することが求められている。このような情報には、医薬品の名前、製造者やどこから得たか、使用目的、どのような申請段階にある製品か、さらには簡単な医薬品成分に関する申請の内容についての説明が求められている。審査官は、医薬品審査センターでの医薬品成分に関する審査結果を提出する報告書に沿って、特に重要な問題点を申請者に伝える必要があるとされている。

#### (4) 必要事項の要約

製品成分の審査において問題となった箇所について要約の作成が求められている。問題となる箇所については申請者との議論やレターでの通知することが必要とされている。

#### C. 4. 2. 2 製品製造—製造工程

審査報告書の「製造工程」の項には、細胞治療薬製品の製造と精製を通じて用いられる全ての工程についての詳細な情報が含まれていなければならない。製造及び精製工程や製造工程管理試験や製品での試験に関する概略図を添付することは非常に有用である。そのような概略図が申請者から提出されていれば審査報告書にそれを添付するべきである。

#### (1) 自己または非自己ヒト由来細胞の調製

審査官は調査報告書に以下の点について記載することが求められている。

##### a. 細胞の採取／加工方法及び培養条件

調査報告書には採取した細胞浮遊液の量と細胞数の記載が必要とされている。また、採取に当たっ



での機械的、酵素的な処理方法や細胞採取に用いる機器や用具について記載も必要とされている。これらには、細胞を分離するための密度勾配遠心法や磁気ビーズ、あるいは蛍光励起細胞分離装置 (FACS) の情報が入る。また、フラスコ培養やバック培養などの細胞培養系について、用いる培養系が閉鎖系になっているのか開放系なのかについての情報も含まれる。また、全ての工程管理試験について記載が求められている。

#### b. 細胞の投与前照射

自己あるいは非自己ヒト由来細胞を投与前に放射線照射する場合、細胞の増殖能が喪失していることを示す申請書のデータを記載しておくことが必要とされている。また、放射線照射後も細胞の治療目的とされる機能が維持されていることを示す証拠について十分に審査し、その結果の記載が求められている。細胞放射線照射装置の照射線量の校正に関する情報も必要とされている。

#### c. 工程スケジュールと中間製品での保管

審査官は細胞の採取からハーベストまでの各ステップで必要な時間経過の記載が求められている。必要に応じて、各ステップでどのような試験がいつまでに行われなければならないかを明らかにしておく必要があるとされている。また人に投与するまで凍結保存するのであれば、その前後での安定性のデータの記載も求められている。細胞の採取からハーベストまでの間の細胞を保存するタイミングや保存条件の記載も同様である。保存に当たってバルクハーベストの安定性を担保するために十分な方策がとられているかを明確にすることが求められている。

#### (2) 最終ハーベスト

最終ハーベストの段階で細胞を製剤化するために遠心操作を行うかどうかについての記載も必要とされている。これには遠心操作における細胞の洗浄条件や用いる洗浄液についても含まれる。細胞は製剤化後、凍結保存されるのかあるいはすぐに患者に投与されるのかについて明らかにする必要があるとされている。最終ハーベスト細胞を保存する場合、保存方法、保存期間の記載が必要とされている。

#### (3) 製剤化

審査報告書の中に製剤化の詳細についての記載が求められている。また、製剤化する際に成長因子やヒト血清アルブミン等の添加剤が含まれているかについて、またそれをどのような原料から得たのかについても明らかにすることが必要とされている。これにはタンパク質成分をどの供給者から得たのか、および用いた濃度が含まれる。さらに、最終製品での細胞密度等についての記録が必要とされている。また、投与の行われる医療機関に凍結して

送付される場合は、どのような条件で輸送されるのか、一定した解凍条件を保証するデータがあるかについて審査報告書に記載する必要があるとされている。

#### (4) 記載しておく必要がある製品の製造に当たっての注意事項

審査官は最終製品の製造工程に関する審査において特に重要と思われる箇所についての要約の作成が必要とされている。重要と思われる箇所については申請者と議論するかレターでの通知等が求められている。

#### C. 4. 3 製品の試験

細胞治療薬の製剤の試験には安全性確保の観点から微生物試験 (無菌試験、マイコプラズマ試験、迷入ウイルス試験) や確認試験、純度試験 (エンドトキシンを含む)、生存率試験、力価等の製品の特性を評価するための試験が必要とされている。またこれ以外の試験が必要になることも想定されている。申請者が、セルバンクの作製や製造工程そのものの評価、さらには各製品のロットごとの品質や製品の一定性を確保するために、製造工程を通じて適切な試験を設定しようとしているかを明らかにするように求めている。製造工程が適切にコントロールできていない場合には、ロットごとの製品の恒常性を担保することは困難である。このような場合は、目的とする臨床効果を得るための製造における重要なパラメータを設定することも困難になるとされている。審査官は「バイオテクノロジー医薬品を含むヒト生物由来製品の同一性、同質性を離礁するための FDA 指針」<sup>58</sup>を参考にすべきとされている。新薬治験審査に当たっては、中間製品や最終製品の基準に用いられている規格を明記させることが必要とされている。この規格には製品の品質や製造に用いる原料の確認を含めた品質基準 (すなわち試験法、工程管理、受け入れ試験) が含まれる。受け入れ基準は、採用しようとしている試験の限度値やその幅、あるいは他の規格値が含まれる。審査官は申請者から提出された試験結果に基づいて採用されている受け入れ基準が適切かどうかを評価すべきとされている。また、開発段階でのデータに基づいて申請者が採用しようとしている規格の適切性についても評価すべきとされている。なぜならば、出荷基準は製品の承認に向けた製品の開発過程で確立していく必要のあるものだからである。出荷基準と規格には次のようなものが含まれるとされている。

##### C. 4. 3. 1 微生物試験

申請者が、微生物試験を細胞バンク、中間工程、最終製品の各段階で適切に実施しようとしているかを評価することが必要とされている。

### (1) 無菌性試験（細菌及びカビの試験）

無菌試験に関して次のような情報が提供されているかどうか。

#### a. 試験方法

申請者が最終製品で無菌試験を実施しようとしていることの確認。適切な試験法としては FDA の生物製剤基準 21CFR610.12 に記載されている試験法や米国薬局方に記載されている試験法<sup>59)</sup>があげられている。申請者が他の方法を採用している場合には 21CFR610.12 に記載されている方法との同等性を評価しておくか、「試験や工程の同等性」に関する生物学的製剤基準 21CFR610.9 に従った承認が必要とされている。もし、製造に抗生物質を用いている場合には試験に先立って抗生物質が除去されていなければならない。抗生物質の除去が不可能な場合には米薬局方に従って静菌作用や静カビ作用についてあらかじめ評価しておくことが求められている。このような評価により、製品の中に含まれる残存抗生物質が無菌試験の結果に及ぼす妨害作用がないことを担保することができる。

#### b. 試験のタイミング

申請者は製造の重要なポイントで無菌試験を実施することが多い。例えば、培養期間を超えて培養した検体を用いたり、細胞の活性化や他の加工を施したりするような製造の重要なポイントの後でルーチンに無菌試験を行う。審査官は工程管理試験として無菌試験が行われているかどうかについて審査報告書に記載することが求められる。採用されようとしている工程管理の無菌試験が妥当であるか評価し、あるいは必要に応じて申請者と議論することが求められている。どのような工程管理無菌試験を採用するかについては申請者の責任において判断するべきとされている。

無菌試験は最終製品の必須の規格として設定し、製品は無菌試験に合格していなければならない。最終製品を使用前に凍結する場合には、申請者は凍結前に無菌試験を行い患者に投与する前にその結果を得ておく必要がある。しかし、解凍後に洗浄や培養といった閉鎖系でない操作を行う場合には解凍後に無菌試験を繰り返すことが必要とされる。細胞を 14 日間の無菌試験の結果が出る前に患者に投与する必要がある場合には、最終原液のハーベストの 48-72 時間前に試料を採取するか、培養の最終培地交換時の後に試験を行い、製品の出荷の前に結果を得ておくべきとされている。この場合、患者に投与後でも 14 日間試験を継続して結果を得るようにしなければならない。14 日間の無菌試験の結果が、患者に投与する前に得られない場合には、申請者に最終製品についてグラム陰性試験と最終無菌試験を行わせるように求めるべきとされている。この試験を行うことにより、48-72 時間菌の増殖がないこと、及びグラム染色がないことを出荷試験として担

保させるべきである。治療開始後に製品に菌の混入が見いだされた場合の対処方法についてその適切性を評価しておく必要がある。菌が混入した医薬品が患者に投与された場合には重大なリスクが発生する可能性が高いことより重大な副作用発生の報告基準 21CFR312.32C に従って FDA 及び治験に参加している全ての研究者に情報を提供する手続きも含まれている必要があるとされている。

### (2) マイコプラズマ

培養した細胞を集めて洗浄する前等のマイコプラズマ検出のもっとも適したタイミングで試験が行われているか確認をしておくことが求められている。試験は細胞と培養液の両方について行っているかを明らかにすることが必要とされる。マイコプラズマが混入するルートにはいくつかの汚染源が考えられる。そのうち、培養に用いる動物血清及び非閉鎖系での培養系を採用している場合からの混入がもっとも大きな汚染源となりやすい。長期にわたる培養では工程内管理試験としてマイコプラズマ試験を行っているかを明らかにすることが求められている。細胞治療薬は寿命が限られているために、出荷試験として一般的に推奨されている細胞培養法を採用することが困難な場合が多い<sup>52)</sup>。このような場合には、製剤の試験としてマイコプラズマの検出に PCR 法を採用することも受け入れられている。製品の承認の前に、審査官は、採用しようとしている PCR 法が十分な感度と特異性を持っているかについて申請者と議論をしておくことが求められる。

### (3) 迷入感染因子（ウイルス）

迷入感染因子（ウイルス）の規制に関する多くの情報は、ICH-Q5A ガイドライン「ヒト又は動物細胞株を用いて製造されるバイオテクノロジー応用医薬品のウイルス安全性評価」<sup>60)</sup>及び参考文献<sup>62)</sup>を参照することが望ましいとされている。

#### a. in vitro ウイルス試験

ライン化された細胞を用いる場合は、in vitro ウイルス試験を MCB 及び製造に用いた培養を終了した細胞について行うことが求められている。このアッセイでは試験検体を種々の感受性細胞に添加して行う。細胞の選択は、製品をどのような原材料から得たかによる。試験では製品の製造に用いた原材料と同じ種や組織から得た単層培養細胞を用いる系が必要とされている。またヒトウイルスを検出する場合にはヒトやヒト以外の霊長類から得られた細胞を用いることが必要とされている。さらに、細胞傷害性ウイルス及び血球凝集性ウイルスの両方を検出できるような試験法を採用することが必要とされている。審査報告書には用いる細胞の種類の記事が求められている。

### b. in vivo ウイルス試験

ライン化された細胞を用いる場合、in vivo ウイルス試験が MCB で行われているか記載することが必要とされている。これらの試験では、被検液を大人及び乳飲みマウス、さらには発育鶏卵などへ接種する。必要な場合、モルモット、ウサギ、猿などの動物への投与も行われる。これらの試験では、被検動物に何らの病的異常が認められてはいけない。審査官は、審査報告書に申請者が用いている被検動物について記載しておかなければならない。申請者に、行った試験結果の評価についても提供させる必要があるとされており、またそれらの結果の要約が審査報告書に記載されるべきとされている。

### c. 迷入ウイルスの特異的検出試験

細胞バンクや最終製品などの製造の異なるステージで特定のウイルス検出試験が行われているかについてその試験法も含めて記載することが求められている。その際に、FDA が認可/承認/審理中のキットが使われているかどうか記載されるべきとしている。治療にはヒト細胞が用いられることから、ヒトで病原性を持つウイルスの試験がなされているかを明らかにするよう求められている。ヒト感染性ウイルスに関しては PCR 反応を用いた試験を採用することができる。CMV、HIV-1 及び 2、HTLV-1 及び 2、EBV、HBV、HCV や他のヒトへの感染性のあるウイルスを対象とすることが求められている。

#### C. 4. 3. 2 確認試験

MCB や最終製品が目的とする製品であること、また製造施設で製造されている他の製品と明確に区別できるような確認試験の設定とその有用性を支持するデータがあるかを明らかにするよう求められている。最終製品が一種類か複数の細胞から構成されている場合には、複数のセルラインを区別できる試験法となっているかを評価することが求められている。MCB の確認試験では、各々の細胞ラインを区別できる手法でなければならない。これらの試験法としては、細胞表面マーカーや遺伝的多型性などが含まれている<sup>46)</sup>。最終製品の確認試験では、ラベルされたバイアルの内容が正しいかを確認できるような試験となっていることが求められている。

#### C. 4. 3. 3 純度

製品の純度とは、製造における不可避的なものを除いた異物の混入がないことと規定できる（生物学的製剤基準、純度）。純度試験には、発熱性物質/エンドトキシン、細胞の活性化や加工に用いたタンパク質やペプチドの混入、製造に用いたサイトカイン、成長因子、抗生物質、血清などの試薬や成分、さらには目的外の形質を持つ細胞も含まれる。

#### (1) 残存している混入成分

審査官は、細胞治療薬の純度試験に関して製造に用いたタンパク質やペプチド、サイトカイン、成長因子、抗生物質、血清などの試薬や成分の試験が設定されているかを記載しておく必要がある。またこれに加えて、目的外の形質を持つ細胞や細胞残査も含まれるべきとされている。また、ICHQ3 ガイドライン「医薬品の残留溶媒ガイドラインについて」<sup>61)</sup>を参考にすることが求められている。

#### (2) 発熱性物質/エンドトキシン

リムルス試験によるエンドトキシン測定は、治験の早い段階で用いられる代表的な発熱試験に代わる試験である（生物学的製剤基準、純度）。申請者がリムルスエンドトキシン試験を採用しようとしている場合には、審査官はそのエンドトキシン試験が「生物学的製剤基準、純度」に書かれた発熱性物質試験と同等であることを「生物学的製剤基準、同等性・同質性」に書かれていることに基づいて説明できるデータを求めるべきとされている。随腔内投与されるような医薬品を除いて、全ての静注薬のエンドトキシン上限値としては1回の投与で、体重1kgあたり5EU以下にすることが推奨されている。随腔内投与されるような医薬品では1回の投与で、体重1kgあたり0.2EU以下にすることとなっている。しかしながら、実際の規格値は申請者の提出したデータに基づくべきとされている。この点に関しては、「ヒト及び動物静注医薬品、生物薬品、医療用具の最終製品でのエンドトキシン検出のためのリムルス試験の評価」<sup>62)</sup>に関するガイドラインの参照が求められている。審査報告書では、エンドトキシン試験の規格について記載するとともに、最終製品での試験が設定され、医薬品の出荷前に結果が分かるかを評価しておくべきとされている。

#### C. 4. 3. 4 力価

製品の生物活性を適切に反映する力価の規格を設定するよう求められている。力価測定に用いられている全ての試験法について評価を行い、その評価結果の記載が求められている。これらの力価試験法は定量性を持つ必要があるが、定性的な側面を持つ場合もある。治験の第2相の終了時まで、申請者はin vivo、in vitro 試験法を含めて適切な力価試験法を設定することが必要とされている。また設定した力価試験法は医薬品の生物活性を適切に反映するものでなければならない。その試験法は承認規格となることが必要とされている。

#### C. 4. 3. 5 その他

##### (1) 一般安全性試験

細胞治療薬は21CFR610.11(g)<sup>46)</sup>「一般安全性試験」を免除されている。

##### (2) 生存率

生存率に関する下限値の規格が必要とされている。体細胞治療薬では、生存率の下限値の規格としては一般的に少なくとも70%は必要である。この下限値の設定が難しくより低い下限値の設定を行う時は、申請者に死細胞や細胞の破片等が投与された医薬品の安全性や治療目的に影響しないことを示すデータの提出を求めるべきとされている。この点についての詳細は、「ヒト細胞治療及び遺伝子治療に関するガイドライン」<sup>46)</sup>の参照が有効とされている。

### (3) 細胞数/投与量

製品の試験及び出荷基準として、製品バイアルに充填される細胞数及び目的機能を持つ細胞数の下限値の規格を設定することが必要とされている。また投与される細胞数の上限値が設定されているかを記載するとともに、設定されている場合にはどのような根拠に基づいて設定されているのかを明らかにさせるべきとしている。

#### C.4.4 最終製品の出荷規格

最終製品とは患者へ投与するために製剤化された製品と規定できる。治験審査報告書には、申請者が提案している試験項目、試験方法、その出荷基準等に関する規格の要約が含まれていなければならない。また必要に応じて最終製品の試験法の感度や特異性に関する事項も必要とされている。試験には製品の安全性、純度、力価、確認試験が含まれていなければならないとされている。最終製品の出荷基準に関する試験は、製造のロットごとに行われているか確認しておくことが求められている。各製品が製造プロセスによっては1つずつのロットを構成している場合もある。最終製品の出荷基準の試験結果は、患者の投与前に得られていなければならない。また投与前に判定ができない最終製品に関しては追加的に結果が分かる試験にどのようなものがあるのか明確にするとともに、その規格値も明記することが求められている。さらに、このような試験で結果が受け入れ基準に合格しなかったときの対処法についても明らかにしておくことが必要とされている。

#### C.4.5 製品の安定性

治験を行う期間にわたって製品の品質が保たれていることを保証するために、治験の早い段階で安定性試験として行うべき項目を明らかにすることが必要とされている（INDの内容と書式）。治験の後期においては、最初に設定した安定性についてより多くの情報が必要であり、また最終的な製品の製剤化や安定性の保証期間を設定するために多くの情報が必要なことを申請者に伝えることが求められている。IND審査においては、行われている治験のステージに応じて安定性に関するデータがどれくらい必要かについては、製品の開発計画に基づい

て評価しなければならないとされている。安定性に関する試験は、それぞれの最終製品ごとに異なる基準で設定されなければならないが、製品の安定性を十分に示すものでなければならないとされている。治験第1相の段階で、どのような安定性に関する対策がとられているか明らかにしておくことが求められる。さらなる情報についてはICHQ5Cガイドライン「生物薬品（バイオテクノロジー応用製品/生物起源由来製品）の安定性試験について」<sup>63)</sup>、「新薬の安定性修正ガイドライン」<sup>64)</sup>、Q1Aガイドライン「安定性試験法ガイドラインについて」<sup>65)</sup>、Q1Eガイドライン「安定性データの評価に関するガイドラインについて」<sup>66)</sup>を参照するべきとされている。

#### 安定性試験プロトコール

安定性試験プロトコールは、中間工程製品及び最終細胞治療製品の両方に適用できるはずである。申請者の提案している安定性試験プロトコールには、製品の無菌性、確認試験、純度、品質及び力価の測定法が含まれる必要があるとされている。各試験法に関して試験方法や検体のサンプリングの時期（試験開始前の検体も含まれる必要がある）、試験を行う温度、さらには製品の安定性を十分に立証できる試験となっているかを示す他の情報についても評価し、その結果を審査報告書に記載することが求められている。安定性試験のプログラムには治験プロトコールや開発計画に対応するような保存期間にわたって上記のようなパラメータに関するデータが得られるように設計されていることが求められている。また、申請に当たって予備的な検討結果についても審査報告書に含まれるべきとされている。

##### ①中間工程製品の安定性試験

細胞を凍結保存する場合は、上記に示すようなパラメータを測定することにより製品を凍結している間の安定性を担保するような試験プロトコールになっていることが求められている。比較方法としては凍結前と保存、解凍後の検体を試験することになる。また凍結保存のように工程を一時止めるステップが存在する場合に安定性試験が設定されているかを記載することが求められている。申請者が提案している試験時期の適切性についても評価することが必要とされている。

##### ②最終製品の安定性試験

最終製品に関して、製品の製剤化や患者への投与までの有効期間にわたって安定に保たれていることを示すデータを評価しその結果を記載しておくことが求められている。また申請者が安定性試験を適切な温度で行っているか、また想定される保存期間にわたって適切なポイントで試験を行っているかを評価するように求められている。治験第3相までの間に加速条件を用いて、安定性試験のバリデーションを行っておく必要があることを申請者に伝