

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

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 15-17 年度 総合研究報告書

主任研究者 早 川 堯 夫

平成18 (2006) 年 4月

目 次

I. 総合研究報告

- 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. 総合分担研究報告

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-----181
ーバイオ医薬品の同等性／同質性評価法の動向ー
川 西 徹
2. 生物薬品の特性・品質解析、品質評価法の検討-----191
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-----236
新 見 伸 吾
4. 改変型タンパク質医薬品開発の国際的動向と品質・安全性確保に関する研究-----286
石 井 明 子
5. 遺伝子治療薬及び細胞組織利用医薬品の品質や安全性確保のための-----295
試験法や基準についての国際動向の研究
山 口 照 英
6. 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-----329
内 田 恵 理 子
7. 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-----350
小 嶋 茂 雄
8. 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-----362
ー薬局方製剤試験の判定基準の標準化に関する研究ー
青 柳 伸 男
9. 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調査研究-----369
檜 山 行 雄
10. 医薬品等の品質・安全性評価-----380
豊 島 聰
11. 国際的動向を踏まえた日本薬局方の国際化-----392
武 田 寧

III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----399

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 医薬品医療機器総合機構・顧問

新医薬品等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平成15年度から3年間で実施した。

1) 米国および欧州における規制状況を基に、わが国におけるバイオテクノロジー医薬品の同等性/同質性評価について考察した。製造工程の変更をうけた生物製品の同等性・同質性評価の基本原則および評価にあたって考慮すべき要件はICH-Q5Eガイドラインとしてまとめられ、我が国においても国内通知された。ICH-Q5Eガイドラインの適用対象外のバイオ後発品の同等性・同質性評価についても同様にICH-Q5Eガイドラインの原則が適用されると考えられるが、非臨床・臨床データが必要とされるケースが多くなることが予想されることから、今後非臨床・臨床試験をあわせた同等性・同質性評価について、議論を深める必要がある。

2) 糖タンパク質性医薬品の糖鎖部分の構造特性解析、品質評価、並びに同等性・同質性、バイオジェネリック評価に応用するため、液体クロマトグラフィー/質量分析法(LC/MS)を用いた糖鎖プロファイリング法の改良とその応用可能性を検証した。安定同位体標識法を組み合わせた定性的、且つ再現性に優れた単糖組成分析、及び定量的糖鎖プロファイリング法の開発、精密質量測定及び多段階質量分析が可能な装置を用いたよりインフォーマティブな糖鎖プロファイリング法の開発を行い、糖タンパク質性医薬品の特性解析における糖鎖プロファイリング法及び糖ペプチド解析法の応用可能性の確認とこれらの方法を用いた糖タンパク質性医薬品の糖鎖構造特性解析のための迅速・簡便なストラテジーを確立した。

3) 新規医薬品・治療法の現状と展望について検討した。作成法の異なる各種抗体医薬品の有用性と問題点、抗体医薬品の作用機序、抗体療法の実現と今後の課題を明らかにした。また、肝幹細胞に関する研究の進展を明らかにすると共に、肝幹細胞を用いた細胞治療などによる肝疾患への臨床応用の可能性と今後の課題を明らかにした。さらに、タンパク質、遺伝子治療、細胞治療を用いた血管新生療法に関する現状と今後の課題を明らかにした。

4) 改変型タンパク質医薬品開発の国際的動向と品質・安全性確保に関する研究として、日米EU三極における改変型タンパク質医薬品の承認状況と各品目の特性を明らかにするとともに、改変型タンパク質に特有の品質・安全性確保における課題を明らかにした。

5) 国際的動向を踏まえた細胞・組織加工医薬品の品質・安全性確保に関する研究として、FDAのガイドライン案を基に、細胞治療薬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を明らかにした。また、欧州医薬品庁の文書を基に、異種細胞治療薬の品質・安全性・有効性確保のための留意事項について、基本的考え方を明らかにした。

6) 国際的動向を踏まえた遺伝子治療用医薬品の品質・安全性確保に関する研究として、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事項、レトロウイルスベクター遺伝子治療による白血病発症機構と安全性確保のための方策を明らかにした。また、腫瘍溶解性ウイルス開発の国際的動向と今後の課題を明らかにした。さらに、FDAのガイドライン案を基に、遺伝子治療薬の新薬治験申請段階で品質、安全性確保上考慮すべき事項を明らかにした。また、遺伝子治療薬の生殖細胞への意図しない移行リスクを最小にするための方策として、生殖細胞への移行リスクを評価するためのスキームを含めた非臨床試験の方法、臨床試験の実施の判断、臨床試験の実施に当たっての対応等について考慮すべき点を明らかにした。

7) 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。

8) 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、含量均一性試験の代替としての質量偏差試験の妥当な適用基準を明らかにした。

9) 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に関する研究として、製剤開発、医薬品品質のリスクマネジメント、品質システムの考え方に関する国際的動向及び医薬品の製品開発、製造工程の近代化を目指すProcess Analytical Technology(PAT)の最近の展開など、医薬品の品質保証体制の変化について明らかにした。

10) 医薬品等の品質、安全性評価に関する研究として、医薬品承認申請資料の国際的な共通化を目的とするコモンテクニカルドキュメント(CTD)の運用に関する欧州での取り組み状況を明らかにした。また、米国の医薬品品質に関わる規制・制度改革を分析し、今後の国際的な規制の枠組みについて考察した。

11) 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、薬局方検討会議による薬局方国際調和の動向、現状と課題、及び国際調和の結果を反映した日本薬局方の国際化推進のために考慮すべき事項を明らかにした。

分担研究者

川西 徹	国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部長
川崎 ナナ	国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 室長
新見 伸吾	国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 室長
石井 明子	国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 室長
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
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 室長
小嶋 茂雄	国立医薬品食品衛生研究所 薬品部長
青柳 伸男	国立医薬品食品衛生研究所 薬品部 室長
檜山 行雄	国立医薬品食品衛生研究所 薬品部 室長
豊島 聰	医薬品医療機器総合機構 理事
武田 寧	日本公定書協会 専務理事

(所属及び肩書は分担研究最終年度のものを記載)

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
伊藤 さつき	国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部
永田 龍二	国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部主任研究官
香取 典子	国立医薬品食品衛生研究所 薬品部 主任研究官
奥田 晴宏	国立医薬品食品衛生研究所 有機化学部長

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。平成 15 年度からの 3 年間で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
- 3) 新規医薬品・治療法の現状と展望に関する研究
- 4) 改変型タンパク質医薬品開発の国際的動向と品質・安全性確保に関する研究
- 5) 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
- 6) 遺伝子治療用医薬品の品質・安全性確保に関する研究
- 7) 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
- 8) 薬局方製剤試験の判定基準の標準化に関する研究
- 9) 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
- 10) 医薬品等の品質・安全性評価
- 11) 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応用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、EMA CHMP 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法について調査した。

B. 2 生物薬品の特性・品質解析、品質評価法の検討

(1) 単糖組成分析及び定量的糖鎖プロファイリング法の開発

1) 試料

PA 単糖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。ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(hCG)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。ピリジルアミノ(PA)化用試薬はタカラ社より購入した。6 重水素置換 2-アミノピリジン(d_6 -AP)は Cambridge Isotope Laboratories 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°C で 20 分間反応させた。溶媒を 60°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°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°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°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 (d_4 -PA) は d_6 -AP を用いて同様に反応させて調製した。

3) 糖鎖加水分解及び単糖の PA 化

糖タンパク質 (25 pmol) 及び標準単糖を 2M TFA-2M HCl (20 μ l) で 100°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 d_0 -AP を用いて d_0 -PA 化し、標準単糖は d_6 -AP を用いて d_4 -PA 化して内部標準とした。

4) 糖鎖の切り出し

hCG 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, USA) 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 hCG 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°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 hCG 及び rhCG (100 μ g) 由来糖鎖に加えて 90°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°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°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°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°C、10分間、1回)。 d_4 -PA 糖鎖は d_6 -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)

カラム: Hypercarb (Michrom BioResource,
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

②MS:

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°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

カラム: Hypercarb (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)

流速: 3 μ l/分

②MS:

装置: ESI-トリプルステージ四重極型 MS/MS
システム TSQ7000

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°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

(2) 改良型糖鎖プロファイリング法の開発

1) モデル標準糖鎖の調製

市販の糖鎖 Man7/D1, Man7/D3, asialo-triantennary (Tri) (Oxford Glycosystems), trisialylated triantennary (TriNA₃), tetrasialylated tetraantennary (TetraNA₄) (Dionex Corporation)、に 0.25M NaBH₄, 200 μl を加え、室温で 2 時間反応させて還元した後、希釈した酢酸を用いて過剰の試薬を分解させ、Envi-Carb (Supelco) を用いて脱塩した。

2) ラット脳膜画分の調製

ラット脳 (生後 3 週齢、湿重量約 1.4 g、日本エスエルシーより購入) 1 匹分当たり冷アセトン 40 ml を加え、ポリトロン(1000 rpm)を用いて氷冷しながら 1 分間均質化した。遠心分離後 (3000 rpm、室温、10 分)、上清を除去し、再度、冷アセトン 30 ml を加え同じ操作を繰り返した。遠心後、クロロホルム/メタノール混液 (2/1, v/v) 40 ml を加え、ポリトロン(1000 rpm)を用いて 1 分間均質化後、室温で 1 時間放置した。遠心分離後 (3000 rpm、室温、10 分)、上清を除去し、再度、クロロホルム/メタノール混液 40 ml を加え、10 秒間均質化後、室温で 30 分放置した。遠心分離後、沈殿をメタノールで 2 回洗浄した。洗浄した沈殿に 0.15 M 塩化ナトリウム、1 mM EDTA 及び 1 mM PMSF を含む 10 mM トリス塩酸緩衝液、pH 7.4 (均質化用緩衝液) 30 ml を加え、ポリトロン(1000 rpm)を用いて 10 秒間均質化を行った。ラット脳 2 匹分をまとめて遠心分離し (10,000×g, 4°C, 20 分)、再度沈殿に均質化用緩衝液を加え (ラット脳, 2 匹分に対し 20 ml)、ポリトロン(1000 rpm)を用いて 20 秒間均質化後、10% Triton X-114 を含む均質化用緩衝液 5 ml を加え、4°C で一晩攪拌し、膜画分の可溶化を行った。可溶化溶液を遠心分離し (10,000×g, 4°C, 20 分)、上清を 37°C で 10 分間放置した後、遠心分離し (3000 rpm、30°C、5 分)、Triton X-114 相と水相に分離した。得られた Triton X-114 相に均質化用緩衝液を等容量加え洗浄し、再び 37°C で 10 分間放置後、遠心分離した (3000 rpm、30°C、5 分)。得られた Triton X-114 相に冷アセトンを 4 倍容量加え、-15°C で一晩放置後、遠心分離し (3000 rpm、4°C、30 分)、膜画分を得た。

3) 可溶性 GPI アンカー型タンパク質画分の調製

得られた膜画分 (ラット脳 2 匹分) を 50 mM トリス塩酸緩衝液 pH7.4 に懸濁し、PIPLC (Molecular Probe) 1 unit を加え、37°C で約 18 時間消化した。50 mM トリス塩酸緩衝液 pH7.4 と全溶液の 1/4 倍容の 10% Triton X-114 を加え (最終 Triton X-114 濃度、2%)、0°C に冷却後、よく攪拌した。反応溶液を 37°C に保温後、遠心分離し (3000 rpm、30°C、5 分)、Triton X-114/水相分離を行った。Triton X-114 相を除いた後、水相に 10% Triton X-114 トリス塩酸緩衝液 pH 7.4 を 1/4 倍容加えて洗浄した。水相に冷アセトンを 4 倍容加え、-15°C で一晩放置後、遠心分離し (3000 rpm、4°C、60 分)、可溶性 GPI アンカー型タンパク質画分を

得た。

4) 可溶性 GPI アンカー型タンパク質画分の SDS-PAGE

可溶性 GPI アンカー型タンパク質画分を 2-メルカプトエタノール及びヨードアセトアミドを用いて、還元カルボキシアミドメチル化後、12.5%泳動ゲル (80×80×1 mm) を用いて、25 mM トリス塩酸塩、0.19 M グリシン、0.1% SDS を含む泳動用緩衝液中 20 mA で泳動させた。分離された GPI アンカー型タンパク質は、Simply Blue™ SafeStain (Invitrogen) を用いて検出した。

5) GPI アンカー型タンパク質の同定

SDS-PAGE で分離された GPI アンカー型タンパク質の主なバンドを切り取り、約 1mm 角のゲル片にした後、30%アセトニトリルで脱色し、さらに 50%アセトニトリルを用いて脱水後、乾燥ゲル片に 0.1 M トリス塩酸緩衝液 pH 8.0、50 μl 及びトリプシン (質量分析用グレード、Trypsin Gold、Promega) 1 μg を加え、37°C で一晩ゲル内タンパク質の消化を行った。50%アセトニトリル及び 5% トリフルオロ酢酸水溶液 (抽出溶液) 300 μl を加え、30 分間断続的に超音波照射し、ペプチドを含む抽出液を回収した。再度、抽出を行った後、抽出液をすべて回収し、Speed Vac を用いて濃縮した。そして、以下の条件で、得られたペプチドの LC/MS/MS 分析を行った。データ依存的に得られた MS/MS スペクトルを用いて、検索エンジン Mascot (MatrixScience) 及びデータベース MSDB によりタンパク質同定を行った。

HPLC :

装置 : Paradigm MS4 (Michrom BioResource)
カラム : MAGIC C18 (Michrom BioResource 製, 0.2×50 mm, 3μ)
溶離液 A : 0.1%ギ酸を含む 2%アセトニトリル水溶液
溶離液 B : 0.1%ギ酸を含む 90%アセトニトリル水溶液
グラジエントプログラム :
B 液 : 5~65% (0~20 分)
流速 : 2 μl/min

MS, MS/MS :

装置 : Qstar Pulsar i (Applied Biosystem)
イオン化 : nano-ESI
測定モード : ポジティブイオンモード
スプレー電圧 : 2500V
スキャン範囲 (m/z) :
Q/Tof-MS : 400-2,000
MS/MS : 100-2,000
コリジョンエネルギー : 50-80 eV

6) 還元化遊離糖鎖の調製 (Thy-1 のゲル内 PNGase F 消化、遊離糖鎖の抽出、遊離糖鎖の還元)

SDS-PAGE ゲルより Thy-1 を含むバンドを切り取り、約 1 mm 角のゲル片にした後、30%アセトニトリルでゲル片を脱色した。さらにゲル片を50%アセトニトリルで脱水した後、50 mM リン酸緩衝液、pH 7.2、及び PNGase F (Roche Diagnostics GmbH) 3 unit を加え、37°Cで一晩消化した。消化後、水 300 μ l を加え、30 分間断続的に超音波を照射し、糖鎖を含む抽出液を回収した。合計 3 回の抽出を行い、抽出液をすべて回収し、凍結乾燥した。0.25M NaBH₄、200 μ l を加え、室温で 2 時間反応させた後、希釈した酢酸を用いて過剰の試薬を分解させ、Envi-Carb (Supelco) を用いて還元化糖鎖を精製した。

7) 糖鎖の解析、LC/MS/MS

以下の条件で調製した還元化糖鎖の LC/MS/MS 分析を行った。

HPLC :

装置 : Magic 2002 (Michrom BioResource)
カラム : Hypercarb (0.2×150 mm, 5 μ)
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 : 5~30% (0~60 分)
流速 : 2 μ l/min

Liner ITMS-FT ICRMS :

装置 : Finnigan LTQ FTTM (Thermo Electron 社)
イオン化 : nanoESI
キャピラリー温度 : 200°C
キャピラリー電圧 : 2.0 kV
スキャン範囲 (m/z) : 700-2,000
衝突エネルギー : 35%
測定方法 :

- ① Full MS scan (positive ion mode)
- ② Data-dependent MS² (positive ion mode)
- ③ Full MS scan (negative ion mode)
- ④ Data-dependent MS²(negative ion mode)
- ⑤ Data-dependent MS³(negative ion mode)
- ⑥ Data-dependent MS⁴(negative ion mode)
- ⑦ Data-dependent MS⁵(negative ion mode)
- ⑧ Data-dependent MS⁶(negative ion mode)

(3) 糖タンパク質性医薬品の糖鎖構造特性解析のためのストラテジーの開発

1) ペプチドの調製

還元カルボキシメチル化した hCG (100 μ g) を 100 mM トリス塩酸 (pH 8.0) 100 μ l に溶かし、トリプ

シン (3 μ g) を加えて、37 °C で 18 時間消化した。

2) 糖鎖の調製

(1-4) に準じて切り出した糖鎖は、NaBH₄ で還元した後、Envi-Carb を用いて脱塩した。

3) ペプチドマッピング

以下の条件で LC/MS¹⁻⁴ を用いたペプチドマッピングを行い、データ依存的に得られた MS²⁻⁴ スペクトルを用いてデータベース検索を行った。

HPLC :

装置 : Paradigm MS4
カラム : MAGIC C18 (0.2×50 mm, 3 μ)
溶離液 A : 0.1%ギ酸を含む 2%アセトニトリル水溶液
溶離液 B : 0.1%ギ酸を含む 90%アセトニトリル水溶液
グラジエントプログラム :
B 液 : 5% (0~10 分), 5~65% (10~70 分)
流速 : 2 μ l/min

MSⁿ :

装置 : Finnigan LTQ
イオン源 : nanoESI
キャピラリー温度 : 200°C
キャピラリー電圧 : 1.8 kV
スキャン範囲 (m/z) : 300-2,000
衝突エネルギー : 35%
測定方法 :

- ⑨ Full MS¹ scan (positive ion mode)
- ⑩ インソース CID
- ⑪ Data-dependent MS²⁻⁴ (positive ion mode)

Database search analysis :

検索エンジン : TurboSEQUENT (Thermo Electron)
データベース : NCBInr

6) 糖鎖の解析

以下の条件で糖鎖の LC/MSⁿ を行った。

HPLC :

装置 : Paradigm MS4
カラム : Hypercarb (0.2×150 mm, 5 μ)
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 : 5~40% (0~60 分)
流速 : 2 μ l/min

MSⁿ :

装置 : Finnigan LTQ
イオン源 : nanoESI
キャピラリー温度 : 200°C

キャピラリー電圧：1.8 kV
スキャン範囲 (m/z)：450-2,000
衝突エネルギー：35%
測定方法：

- ① Full MS¹ scan (positive ion mode)
- ② Data-dependent MS²⁻⁴ (positive ion mode)
- ③ Full MS¹ scan (negative ion mode)
- ④ Data-dependent MS²⁻⁴ (negative ion mode)

糖略語

Fuc, フコース; Gal, ガラクトース; Hex, ヘキソース; HexNAc, N-アセチルヘキソサミン; NeuAc, N-アセチルノイラミン酸

B. 3 新規医薬品・治療法の現状と展望

(1) 抗体医薬の現状と展望

ヒト型抗体医薬の作成法、各ヒト型抗体医薬の長所と短所、作用機序ならびに現在認可されている抗体医薬それぞれの特徴について、参考文献 1~45 を中心に調査、研究を行なった。

(2) 肝幹細胞を用いた肝疾患に対する細胞治療の現状と展望

肝幹細胞の由来、肝細胞への分化誘導に関する最近の知見および肝幹細胞を用いた細胞治療などによる肝疾患への臨床応用の現状と展望について、参考文献 46~65 を中心に調査、研究を行なった。

(3) 血管新生療法の現状と展望

これまで試みられてきた血管新生療法として、タンパク質、遺伝子治療、細胞治療を用いた各種の方法に関する現在の状況や今後の課題とともに、血管新生療法の戦略を立てる場合に基礎となる血管成長の生物学的プロセスについての最近の知見について、参考文献 66~69 を中心に調査、研究を行なった。

B. 4 改変型タンパク質医薬品開発の国際的動向と品質・安全性確保に関する研究

改変型タンパク質医薬品開発の国際的動向を、米国食品医薬品庁 FDA、米国 Biotechnology Industry Organization、欧州医薬品審査庁 EMEA、European Commission - Enterprise and Industry DG - Pharmaceuticals、医薬品医療機器総合機構の医薬品に関するサイト及び参考文献 70,71 を参考に調査した。

B. 5 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

(1) 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」を中心に調査研究を行った。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を行い、我が国や EU との規制の違いや、共通する重要事項などを明らかにした。

(2) EMEA の「異種細胞治療医薬品に関する留意事

項」(Point to consider on xenogenic cell therapy medicinal products. December 17 2003, EMEA)を中心に調査研究を行った。また、関連する各種基準やガイドライン等についても調査研究を行い、我が国や FDA との規制の違いや、共通する重要事項などを明らかにした。

B. 6 遺伝子治療用医薬品の品質・安全性確保に関する研究

(1) 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」(Position statement on development and manufacture of lentiviral vectors; 現在は Guideline 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。

(2) 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。

(3) 腫瘍溶解性ウイルスに関する総説を中心に、論文、学会発表資料、ウェブ公開資料等を調査し、腫瘍溶解性ウイルスに関する研究の現状と問題点について検討した。

(4) FDA が 2004 年 11 月に FDA 審査官および申請者に向けて発出した「遺伝子治療薬の新薬治験申請(IND)における化学、製造及び品質管理(CMC)に関する情報の内容と審査」ガイダンス案(Guidance for FDA review staff and sponsors: Content and review of chemistry, manufacturing, and control (CMC) information for human gene therapy investigational new drug applications (INDs), draft guidance, Nov. 2004)を中心に、関連する各種基準やガイドラインについても調査研究を行い、遺伝子治療薬の品質、安全性確保において考慮すべき点やわが国との規制の違いなどを検討した。

(5) ICH 見解案の「遺伝子治療用医薬品の生殖細胞への意図しない移行リスクを最小にするための方策」を中心に調査研究を行った。また、関連する指針として EMEA のコンセプトペーパー(EMEA/CHMP/SWP/110180/2004: id Concept paper on the development of a committee for medicinal products for human use (CHMP) guideline on non clinical testing for inadvertent germline transmission of gene transfer vectors)についても調査研究を行い、我が国や FDA との規制の違いや、共通する重要事項などを明らかにした。

B. 7 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 (平成 15 年度小嶋分担研究資料 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. 8 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、質量偏差試験の妥当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. 9 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

ICH Q9 ガイドラインが 2005 年 3 月に専門家会議において合意 (STEP2) が達成され、2005 年 11 月では最終文書合意に至った過程、製品開発及び製造工程の近代化をめざす Process Analytical Technology (PAT) の最近の展開、新たにトピックにとりあげられた Quality System (Q10) の議論の進捗について検討した。

B. 10 医薬品等の品質・安全性評価

(1) CTD の運用に関する取り組み

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 年度事務連絡された Q&A および平成 14 年度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。

(2) 米国における医薬品品質に関わる規制・制度の改革

FDA が 2002 年 8 月以降公表した下記報告書を調査の対象とした。

- The Food and Drug Administration's Strategic Action Plan: Protecting and Advancing America's Health: Responding to New Challenges and Opportunities, August 2003 (<http://www.fda.gov/oc/mcclellan/strategic.html>)
- Pharmaceutical cGMPs for the 21st Century - A Risk-Based Approach: Final Report - Fall 2004 (<http://www.fda.gov/cder/gmp/gmp2004/G>

[MP_finalreport2004.ht m#_Toc84065736](#)

さらに FDA 当局者の ICH 横浜会合 (2004 年 11 月、横浜) における FDA の品質規制に係わる方針に関する講演も参考とした。

B. 11 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、販売承認は、申請用のデータを得た時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、製造方法を変更し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、医薬品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、生産コストの削減のみならず、医薬品の品質の改善に結びつくケースも多く、安全性の観点からも好ましいケースが少なくない。そのため、変更の際、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の阻害要因にもなりうる。そのため、これら医薬品の製法変更時の評価法について、妥当な方法の確立が求められてきた。

バイオテクノロジー応用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・判定法を定めることは難しい。また製造技術が多様であるため、それに応じた不純物、混入物等の解析が必要である。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、製品の特徴を考慮しつつ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、製法の異なるバイオテクノロジー医薬品の同等性・同質性の評価法を確立するための基礎資料を提供するために行った。

C.1.1 米国における同等性・同質性評価プロトコールの定着

C.1.1.1 その経過

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月に公表されたが、(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薬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.1.1.2 FDA 同等性・同質性評価プロトコルに関するガイダンス

2-1 同等性・同質性評価プロトコルの作成マニュアルとしてのガイダンス案

2003 年 9 月、生物薬品の製法変更時の同等性・同質性評価方関係第三のガイドラインのドラフトが FDA によって公表された。テーマは「製薬業者に向けたガイダンス - 同等性・同質性評価プロトコル - タンパク質性製品および生物製品 - 化学、製造、そして管理情報」(Guidance for Industry Comparability Protocols - Protein Drug Products and Biological Products - Chemistry, Manufacturing, and Controls Information) である。このガイダンスは、米国において約6年間実施されてきた同等性・同質性評価プロトコルの制度について、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ル作成のための手引き”である。

2-2 同等性・同質性評価プロトコルの作成マニュアルガイダンス案からみえてくるもの

今回の案は同等性・同質性評価プロトコルの詳細な手引きであり、米国でこのプロトコルシステムが定着しつつあることが伺われる。

内容をみると 1997 年のガイダンスが同等性・同質性評価プロトコルの目的、基本的な分類の説明であったのに対し、今回のガイダンスはこのプロトコルに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ふれていたが、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、特定できない (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 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、確立し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・同質性評価プロトコルという文書システムに変えることによって、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困難と言える。即ち、規制当局に CMC に関する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ろう。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、米国においてでさえ、プロトコ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.1.2 ICH-Q5E バイオ医薬品の製造方法変更の際し

ての同等性／同質性評価ガイドラインの国際合意

C.1.2.1 国際調和に至る経過

ICH におけるバイオ医薬品の同等性／同質性評価ガイドラインについては、2002年2月のブラッセル会議においてコンセプトペーパーが認められ、ICH における正式テーマとして採用された。しかし FDA の体制が十分ではないという理由により、公式な第一回専門家会議が開かれたのは翌年2月の舞浜会議であった。その後ブラッセル(7月)、ワシントン(9月)での専門家会議を経て、大阪で開かれたICH6(12月)でステップ2に達した。その後各極でパブリックコメントを集めるとともに、2004年6月のワシントンでの専門家会議で、非臨床、臨床の専門家の意見を集約、追加し、2004年11月横浜で開催された専門家会議でステップ4に達した。このガイドラインは日本語に翻訳され、2005年4月に国内通知として公表された。ステップ4文書、および国内通知は平成16年度川西分担研究報告書の添付書類1、添付書類2の通りである。

C.1.2.2 ICH バイオ医薬品の同等性・同質性評価ガイドラインにおける論点

(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。平成15年度分担研究報告書にも記したように、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も大きな違いはない。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、具体的な同等性・同質性評価には大きな相違があるので、同じガイドラインにまとめることは困難」、という理由で適用対象から外すという主張を行い、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ちて「同等・同質」と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。」とした。

(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、そして工程の解析・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により、本ガイドラインは品質面からの観点を中心に記述したものであることが明記され、非臨床試験、臨床試験による同等性・同質性評価については、評価にあたって考慮すべき事項を列記することにとどめた。

C.1.3 ICH-Q5E ガイドライン後に残された課題

C.1.3.1 品質に関わる問題

本文書はバイオ医薬品の製造工程が変更された際の変更前後の製品の同等性／同質性評価法に関する基本的な考え方を示したものであり、特定製品の製造工程変更、あるいは同等性評価に際しての具体的な方法を説明したものではない。したがって、ガイドラインの国際調和作業の過程においても、主に欧州製薬業界から、製造方法変更の種類に応じたデシジョンツリー方式のような同等性／同質性評価作業に関する具体的な記述をするよう、度重なる要求が出された。しかし、(1)実際の同等性／同質性評価作業は製造工程変更の種類、製品の違いによって異なり、一般化は困難、(2)欧州の同等性／同質性評価ガイドラインに示されているように、製造工程変更の影響を事前に予測することはできないのでデシジョンツリー方式のような記述は困難、という捉え方が3局の規制当局の共通する認識であったため、本文書は評価作業の原則のみにとどめた。また米国 FDA においては、同等性／同質性評価の実施とリンクした同等性／同質性評価プロトコル制度の整備を進めているが、この制度は欧州や日本の審査体制では採用は困難である。したがって、同等性／同質性評価作業の詳細についての調和ガイドラインの作成は困難と考えられた。

しかし、品質特性の評価のみで結論がでるケースの場合でも、物質や製法変更をカテゴライズし、個々のケースに関するガイドの作成は、本ガイドラインに従う評価作業を効率的に進める上で望まれるところであろう。この点に関しては、目的物質別の考え方を平成14年度総合報告書に提案したが、わが国におけるモデルになると考えられる。

C.1.3.2 非臨床、臨床試験を交えた同等性／同質性評価に関わる問題

本ガイドラインは、上に記したようにバイオ医薬品の品質分野の専門家グループによってステップ2文書が作成され、パブリックコメントを集める過程と併行して非臨床、臨床の専門家の参画を得て非臨床、臨床の立場からのコメントを取り入れ、ステップ4文書を完成させた。その間、品質特性の比較検討は同等性／同質性評価作業に必要な不可欠という認識については、非臨床、臨床の専門家も同意したものの、非臨床、臨床試験による相当な検討が必要な場合も少なくないという認識を示す専門家もいた。筆者が承認審査等で経験している例においても、品質特性の比較がまず重要であるもの

の、それでは結論を下すには十分ではなく、実験動物あるいはヒトにおける血中動態の比較データが必要と思われる例は少なくない。また適切な臨床マーカーがある場合には、PD 試験あるいは PK/PD 試験による検討が必要と考えられるケースもある。後者のケースは特に培養工程の変更により糖タンパク質の糖鎖プロファイルに明らかな変化が現れた場合に多い。したがって、もっと踏み込んだ Q and A の作成が近々に求められるものと思われる。

以上の議論は Q5E の適用範囲から除外された後発品を対象として、同等性/同質性を論じる場合には、必須な課題となって浮かび上がる。Q5E の議論においては、欧米の規制当局からバイオジェネリックを適用対象から外すように強い要望が出され、同等性/同質性評価を科学としてみれば何ら違いがないことを主張する日本と鋭く対立した。欧米のこの主張は、特に欧州の同等性/同質性ガイドラインが後発品をも適用範囲としているという事実から考えると不思議なことであった。しかし当時欧州の規制当局内部ではバイオジェネリック第一号の申請を扱っており、その行方が極めて政治性を帯びたものとなっていたことが判明した今、当時の欧州の主張の背景を理解することはできる。欧州では同等性/同質性ガイドラインの適用範囲として、いわゆる“second manufacturer(後発業者)”が、先発業者の製品と同等/同質を主張して製品を申請した場合、即ちバイオジェネリックもあげており、同等性/同質性評価において非臨床、臨床データが重要なものとなるケースを扱う必要が生じた。そのため、ガイドライン本体と別に、非臨床、臨床に関する補遺を作成したことは、平成 14 年度川西分担研究報告書に記した通りである。

C.1.4 バイオ後発品の同等性・同質性評価の国際動向

C.1.4.1 バイオ後発品、登場間際

バイオ医薬品は 1982 年に米国でヒトインスリンを第一号として認可され、その後様々な製品が開発され、世界各国で認可されている。現在、バイオ後発品開発の動きが話題となっている一番の理由は、2001 年から特許切れの製品がでてきたことであり、その数は序々に増えている(平成 16 年度川西分担研究報告書、表 1 参照)。タンパク質性医薬品の場合、化学薬品のように構造が判っていれば製造は比較的容易という訳ではないので、多くのメーカーが後発品の開発をめざすとは思われない。しかしながら、主として欧米の後発品メーカー、あるいはアジア諸国の製薬企業を中心に、バイオ後発品開発の機運が高まっている。またバイオ医薬品の製造技術を有する先発メーカーにおいても、余剰の生産設備を利用した後発品の製造を始めようとする動きがある。

バイオ後発品の開発の機運が高まっている第 2 の理由としては、先進国における医療費高騰があげられる。先進国においては、高齢化も相まって医療費の高騰が社会経済的に大きな負担となっており、医療費の中で大きな割合を占める薬剤費の節約は医療費削減に向けて大きな目標となっている。

我が国においては、バイオ後発品について今現在具体的な承認申請の動きはないが、いくつかの製薬企業がその期を伺っているようである。

C.1.4.2 欧州におけるバイオ後発品の承認申請の動き

実際に承認申請までに至っているケースとしては、1993 年サンド社がヒト成長ホルモン製剤 Genotropin の後発品であるオムニトロープの申請を行い、EMA(欧州医薬品審査庁)の科学委員会である CPMP が承認を勧告したにもかかわらず欧州委員会が認めなかったという複雑な動きが明らかとなっている。その背景としては、バイオ後発品の規制上の扱い、および評価法が明確になっていなかったことがあると思われる。

当初欧州 EMA が 2002 年に施行した同等性/同質性評価ガイドラインの適用対象には、先発メーカーが製造工程を変更した場合ばかりでなく、後発メーカーが先発品と同等と主張して承認申請する場合も含まれていた(平成 13 年度川西分担研究報告書参照)。即ち同等性・同質性評価の基本原則は、先発メーカー内の製法変更であろうと、後発メーカーが先発品と同等と主張して後発品を承認申請した場合でも同じとされていた。しかし、後発品の場合、品質特性の比較のみでは同等性・同質性を示すことが困難な場合が多く、そのため非臨床・臨床試験関係の補遺に関するドラフトを作成し、補強を図ったものの、それでも不十分であり、バイオ後発品を適用対象から切り離すような方針の転換が図られたものと推測される。

EMA はバイオ後発品を対象として、“Biosimilar”の概念を導入し、その評価に関する以下の基本ガイドラインドラフト 3 つ、およびさらに申請が予想される製品別に非臨床、臨床評価についての 4 つの補遺ガイドラインドラフトを 2004 年 11 月～2005 年 6 月に公表して、パブリックコメントを求めた。(平成 17 年度川西分担研究報告書添付資料参照)

1. **GUIDELINE ON SIMILAR BIOLOGICAL MEDICINAL PRODUCTS: CHMP/437/04** (2004 年 11 月)
2. **GUIDELINE ON SIMILAR BIOLOGICAL MEDICINAL PRODUCTS CONTAINING BIOTECHNOLOGY-DERIVED PROTEINS AS ACTIVE SUBSTANCE: QUALITY ISSUES: EMA/CHMP/BWP/49348/2005** (2005 年 3 月)
3. **GUIDELINE ON SIMILAR BIOLOGICAL MEDICINAL PRODUCTS CONTAINING BIOTECHNOLOGY-DERIVED PROTEINS AS ACTIVE SUBSTANCE: NON-CLINICAL AND CLINICAL ISSUES: EMA/CHMP/42832/2005** (2005 年 5 月)
4. **ANNEX GUIDELINE ON SIMILAR BIOLOGICAL MEDICINAL PRODUCTS CONTAINING BIOTECHNOLOGY-DERIVED PROTEINS AS ACTIVE SUBSTANCE: NON-CLINICAL AND CLINICAL ISSUES GUIDANCE ON SIMILAR MEDICINAL PRODUCTS CONTAINING RECOMBINANT HUMAN INSULIN: EMA/CHMP/32775/2005** (2005 年 5 月)

- 5 . ANNEX GUIDELINE ON SIMILAR BIOLOGICAL MEDICINAL PRODUCTS CONTAINING BIOTECHNOLOGY -DERIVED PROTEINS AS ACTIVE SUBSTANCE: NON-CLINICAL AND CLINICAL ISSUES GUIDANCE ON SIMILAR MEDICINAL PRODUCTS CONTAINING SOMATROPIN : EMEA/CHMP/94528/2005 (2005年6月)
- 6 . ANNEX GUIDELINE ON SIMILAR BIOLOGICAL MEDICINAL PRODUCTS CONTAINING BIOTECHNOLOGY -DERIVED PROTEINS AS ACTIVE SUBSTANCE: NON-CLINICAL AND CLINICAL ISSUES GUIDANCE ON BIOSIMILAR MEDICINAL PRODUCTS CONTAINING RECOMBINANT GRANULOCYTE-COLONY STIMULATING FACTOR: EMEA/CHMP /31329/2005 (2005年6月)
- 7 . ANNEX GUIDELINE ON SIMILAR BIOLOGICAL MEDICINAL PRODUCTS CONTAINING BIOTECHNOLOGY-DERIVED PROTEINS AS ACTIVE SUBSTANCE: NON-CLINICAL AND CLINICAL ISSUES: GUIDANCE ON BIOSIMILAR MEDICINAL PRODUCTS CONTAINING RECOMBINANT ERYTHROPOIETINS: EMEA/CHMP/94526/2005 (2005年6月)

さらに2005年12月にこれら7つのガイドラインドラフトについての公開ワークショップが開催され、関係者間の意見交換が行われた。

EMA/CHMPとしては、パブリックコメントおよび公開討論会での意見交換を参考に、最終ガイドラインを作成、合意が得られれば、3月を目途に施行の予定である。

以上のような規制当局の動きと連動するように、2006年1月にOmnitropeが、標準薬であるGenotropinとの同等性/同質性が示され、CHMPからは承認に肯定的な意見があったことが報道され(資料8)、さらに同3月にはソマトロピン後発品であるValtropinの承認についても肯定的な結論が間近に出されるとの報道がなされている。したがって、欧州では近日中にバイオ後発品が承認されることが確実視されている。

C.1.4.3 米国におけるバイオ後発品の承認申請の動き

一方 Omnitrope は米国でもサンド社から2003年7月にFDAに承認申請され、2004年8月にはFDAから審査は終了しており追加コメントはないが、承認の可否について決定するには至らなかった旨申請者に告げられたと報道されている。その理由としては、米国においてバイオ後発品を認可する上での、規制上の枠組みが明確でないことが指摘されている。この経過を不服として、サンド社は2005年9月にFDAを提訴した。

米国におけるバイオ後発品の評価法ガイドラインについては、一昨年までにその作成を目指すためのFDA主催のワークショップ2回開催された。しかしその後評価法ガイドラインの作成作業は中断してい

るようである。背景としては、バイオ後発品の認可に対して、先発メーカーからの強い反対があるものと推測される。FDAはそれまでバイオ後発品に関するワークショップを主催し、ガイドライン作成の姿勢を示していたが、2005年12月の3回目のワークショップは、タンパク質性医薬品の同等性/同質性評価のための特性解析技術に関する討論を中心としたものとなり、バイオ後発品評価ガイドラインの中味に関する具体的な討論は行われなかった。

C.1.4.4 欧米におけるバイオ後発品の規制の枠組み

(4-1) 欧州の場合

欧州では、サンド社による Omnitrope の簡易医薬品申請をうけて、バイオ後発品の承認審査を、どの規制ルートにあてはめるかの議論が開始された。その結果、欧州におけるヒト医薬品の申請に関する法律(Directive 2001/83/EC)中のジェネリック(Article 10(1)(a)(iii))の承認申請のために必要とされる評価資料では十分でない場合があるとし、2003年6月に当該法律を改正し、SBMP(Similar Biological Medicinal Product)というカテゴリーを追加した(Directive 2003/63/EC)。SBMPでは、品質特性、および生物学的同等性評価のみからでは同等と結論できない場合は、さらに毒性学的プロファイルおよび臨床プロファイルデータが必要であり、それらの試験で必要とされるデータの程度はケースバイケースであること、またその判断については関連ガイドラインを参照することとした。SBMPの承認申請にあたっては、通常Module1、Module2、およびフルのModule3に加えて、品質特性に関する同等性/同一性評価データ、および略式非臨床、臨床データ、それに加えて同等性/同質性非臨床、臨床評価データが必要となる場合がある。

同等性/同質性評価を行う上で参照すべき関連ガイドラインは、先発メーカーによる製法変更時ではICH-Q5Eガイドライン、SBMPの場合では(2)であげた7つのガイドラインである。SBMPの関連ガイドラインとしては、非臨床/臨床評価(EMA/CHMP/42832/2005)の補遺として、さらにインターフェロンおよびモノクローナル抗体の非臨床、臨床試験ガイドラインが更なる検討対象とされているようである。

このように欧州ではバイオ後発品申請にあたっての規制ルートの整備は最終段階にある。

(4-2) 米国の場合

米国においては、生物製品の承認申請の規制上のルートとしては、

(A) PHS法(Public Health Service Act: 公衆衛生サービス法):「遺伝子および細胞治療薬、血液製剤、ワクチン、抗毒素およびアレルギーならびにその抗体、製法においてまた試薬として使用されるタンパク質」を対象

(B) FDC法(Food, Drug, Cosmetic Service Act: 食品医薬品化粧品法):「モノクローナル抗体、サイトカイン、成長因子、タンパク質、インターフェロン、動物または微生物から抽出される医療および免疫療法用タンパク質などの生物製品、および化学合成

医薬品」を対象の二つがある。

(A)においては、BLA(Biologic License Application: 生物製剤申請)にあたって、申請者によって示された品質、有効性、安全性を明らかにするデータが必要とされ、臨床試験を省略するような略式申請はない。このことが、Biogenericは規制上ありえない理由となっており、米国ではバイオ後発品をBiogenericと呼ばずに、通常 Follow-on biologics と呼ぶ。

化学合成医薬品の Generic(既存の製品のコピーとして製造された製品)は(B)の規制下で ANDA申請(21USC § 505(j))の対象として分類され、製剤学的同等性および生物学的同等性からなる治療上同等性(Therapeutic equivalent)が明らかにされているのなら、それ以外の非臨床、臨床データなしに承認申請される。

(B)においては上記ANDA申請以外に、ペーパーNDA申請と呼ばれるもう一つの略式申請のルートがあり(21USC § 505(b)(2))、従来からもモノクローナル抗体、サイトカイン、成長因子、タンパク質、インターフェロン、動物または微生物から抽出される医療および免疫療法用タンパク質に、このルートで承認された製品がある。この申請では、有効性、安全性を示す臨床データについては、申請者以外によるデータを引用することが可能である。したがって、バイオ後発品の申請にあたってこのルートにあてはめる可能性が大きい。実際サンド社の Omnitrope はペーパーNDA申請されている。今現在は司法の判断を待つ状態となっているようであるが、今後の承認審査の行方が注目される。

FDAのバイオ後発品の同等性/同質性評価における科学的側面の基本原則は、FDAの専門家によると、既に公表されている先発メーカーによる製法変更時の同等性/同質性評価に関するガイダンス、およびICH-Q5Eの基本原則と同様と判断するようである。ただし、後発品の同等性/同質性評価は、先発メーカーによる同等性/同質性評価に求められる要件を下回ることにはないとされている。また後発品については、臨床試験が求められるケースが増えるので、臨床試験に関する基本原則を扱うガイドラインの整備は必要、というのが、FDAの専門家の基本的な考え方と思われる。

C.1.4.5 バイオ後発品の同等性評価

以上のように、欧米でのバイオ後発品の評価の基本原則は、科学的には先発メーカーの製法変更時の同等性/同質性評価と同じということが共通認識になりつつある。しかしながら、科学的には同様の扱いとはいえ、バイオ後発品の同等性評価においては

- 1) 比較すべき標準物質(先発品)、特に原薬の入手が困難な場合が少なくないこと、および入手できても関連情報が圧倒的に少ない。
- 2) したがって、品質特性の評価では同等性/同質性を示すことができないケースが増え、非臨床、臨床評価の比重が高まる。
- 3) 特に安全性については、市販後の調査に委ねられる部分が多い。

という違いがあり、現実には同等性/同質性評価

の内容はかなり異なったものになることが予想される。とりわけ、我が国においては、臨床試験による同等性/同質性評価の議論が不足しており、コンセンサスの確立が早急に必要になると思われる。

C.2 生物薬品の特性・品質解析、品質評価法の検討

バイオテクノロジー応用技術を利用して、様々な糖タンパク質がバイオ医薬品として開発されている。糖タンパク質関連医薬品の糖鎖部分は、活性等に影響を及ぼすだけでなく、糖鎖抗原として有効性や安全性にも影響を及ぼすこと、また、人為的に制御することが困難である上、製造方法の影響を大きく受けて変化することから、恒常性を確保することが重要とされてきた。しかし、糖鎖の構造は複雑で不均一性が高いため解析が容易ではなく、糖タンパク質性医薬品の特性解析・品質評価、製造方法変更時における同等性/同質性評価、並びにバイオジェネリック医薬品の評価のために、最終産物の糖鎖の恒常性を評価するための技術開発が国際的にも強く望まれている。

我々は、LC/MSを用いて、糖タンパク質の糖鎖に関する構造特性解析法の開発を行ってきた。これまでに、グラファイトカーボンカラム(GCC)を用いたLC/MSによる糖鎖プロファイリング法を開発し、糖タンパク質の構造特性解析に利用してきた。本研究では、昨今の国際的重要課題となっている糖タンパク質性医薬品の糖鎖部分の特性解析、品質評価、並びに製造方法変更時における糖鎖の同等性・同質性やバイオジェネリックの評価等に応用することを目的として、糖鎖プロファイリングの改良及びその応用可能性の検証を行った。

平成15年度は、糖鎖プロファイリングの再現性と定量性の向上を目指して、安定同位体標識法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ドリジルアミノ化(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、定性的、且つ再現性に優れた単糖組成分析、及び定量的糖鎖プロファイリング法の開発を検討した。平成16年度は、精密分子量測定及び多段階質量分析(MSⁿ)が可能な装置を利用して、よりインフォーマティブな改良型糖鎖プロファイリング法の開発を検討した。さらに平成17年度は、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(hCG)をモデル糖タンパク質として用いて、糖鎖プロファイリングと別途見出した糖ペプチド解析法について、糖タンパク質性医薬品の糖鎖部分の特性解析法としての応用可能性を検証するとともに、これらの方法を用いた糖タンパク質性医薬品の糖鎖構造特性解析のための迅速・簡便なストラテジーの構築を目指した。

C.2.1 単糖組成分析及び定量的糖鎖プロファイリング法の開発

C.2.1.1 安定同位体標識法の検討

MSを用いた定量分析において外部標準法を用いた場合、その再現性は20%前後とも言われており、MSを糖鎖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となっている。そこで、糖鎖プロファイリング

法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 AP 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。我々は、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 GCC を用いた LC/MS (CC-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)。 d_6 -AP による標識は、単糖組成分析及び定量的糖鎖プロファイリング法に応用可能と判断した。

C.2.1.2 単糖組成分析

市販の d_0 -PA-単糖混合物 (Gal, Man, Glc, Fuc, GlcNAc 及び GalNAc, 各 1 pmol) を LC/MS に注入し、SIM モードで分析を行った。Fig. 2A は m/z 259 (d_0 -PA-Gal, d_0 -PA-Man 及び d_0 -PA-Glc)、 m/z 243 (d_0 -PA-Fuc)、及び m/z 300 (d_0 -PA-GlcNAc 及び d_0 -PA-GalNAc) をモニターして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_0 -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_0 -PA 単糖に添加して GCC-LC/MS 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_0 -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 を行った。 d_4 -PA 単糖のピーク面積に対する d_0 -PA 単糖のピーク面積の比と d_0 -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_0 -PA 化、過剰試薬の除去操作を行った後、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、GCC-LC/MS 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 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。

さらに、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。糖酸加水分解の条件として、中性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、アミノ糖分析用には 4M HCl 中 100°C で 6 時間加熱する方法がよく用いられて

いる。しかし、この方法では、2 回の加水分解操作を行うことになるので、今回は、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。また、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_0 -AP 及び d_6 -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)、及び (5) はサンプル (d_0 -PA 単糖) のクロマトグラムを示し、(2)、(4)、及び (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_0 -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.2.1.3 PA 糖鎖のプロファイリング

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からなる糖タンパク質で、 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。hCG から N グリカナゼ処理により糖鎖を切り出し、PA 標識した。

我々はこれまで NaBH_4 還元糖鎖の ESIMS を行ってきた。ESIMS における糖鎖のイオン化効率、脂質やペプチドなど他の分子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有用であることが知られている。しかし、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。フラグメンテーションは、糖鎖の構造解析や定量解析に影響を与え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。

Fig. 5 は、 d_6 -PA-hCG 糖鎖をポジティブ及びネガティブイオンモードで測定し、アシアロ複合型 2 本鎖糖鎖 (m/z 863 及び 861) に相当するイオンのみを抽出したものである。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 (Fig. 5A')。この分子は両イオンモードで検出されることから、ポジティブイオンモードで検出されたピーク b 及び c は、分子イオンではなく他の糖鎖から生成したフラグメントイオンであることが推定され、フラグメンテーションはポジティブイオンモードで生じやすいことが示唆された。

Fig. 5B、B' はピーク 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 2 価イオン (m/z 863.3) の他に、この糖鎖からヘキサース (Hex) 1 分子、及び N-アセチルヘキササミン 1 分子分小さい糖鎖のイオン (m/z 1359.4)、及びこれよりさらに Hex 1 分子分小さい糖鎖に相当するイオン (m/z

1197.2)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、PA 糖鎖の分析において、フラグメントイオンはポジティブイオンモードで測定した場合に生じやすく、ネガティブイオンモードによる測定が適していることが明らかになった。

C.2.1.4 安定同位体標識法による hCG 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、また hCG を標準糖タンパク質とし、それぞれを d_0 -AP 及び d_6 -AP で標識して d_0 -PA-rhCG 糖鎖及び、 d_4 -PA-hCG 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_0 -PA-rhCG 及び d_4 -PA-hCG 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、1 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]₅[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、hCG 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 に共通して存在する異性体であるが、rhCG にはいずれの糖鎖も hCG 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 r1 及び r2 の結合量は hCG の約 5-6 倍であるが、hCG では r4 が rhCG の約 2 倍結合していることがわかった。以上のように、モノシアロ糖鎖は hCG 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。hCG 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、hCG 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。hCG 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帰属し、hCG 由来糖鎖と rhCG 由来糖鎖をそれぞれ抽出した結果、Fig. 6B、6C 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、2種類のサンプル間の糖鎖の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再現性の高い差異解析が可能である。従って同位体標識法は糖鎖試験法や同等性・同質性評価法として有用なツールになり得ると考えられる。

C.2.2 改良型糖鎖プロファイリング法の開発

C.2.2.1 モデル糖鎖の高精密質量測定と多段階質量分析

GCC-LC/リニアイオントラップ-フーリエ変換イオンサイクロトロン質量分析 (liner ITMS-FT ICRMS)装置を用いて、中性及び酸性モデル糖鎖 (Man7/D1、Man7/D3、Tri、TriNA₃、TetraNA₄、Fig. 10)の一斉分析を行った。Fig. 11A 及び 11B は、FT ICRMS full MS scan で得られた糖鎖プロファイルの 2 次元(2D、溶出時間対 m/z 、ポジティブ及びネガティブイオンモード)及び 3 次元(3D)表示である。FT ICRMS によって得られた精密質量を基に算出された単糖組成から、15、17、24、33、及び 35 分に溶出された主なピークは、それぞれ、Man7/D1、Man7/D3、TriNA₃ と TetraNA₄ の混合物、TetraNA₄ であることが分かった。

ポジティブ及びネガティブイオンモードにおける各糖鎖の検出強度を比較すると、中性糖鎖である Man7/D1 及び Man7/D3 はポジティブイオンモードで検出され、ネガティブイオンモードではわずかに検出されるのみであることが分かった。また、酸性糖鎖である TriNA₃ 及び TetraNA₄ は、主要な異性体はポジティブ及びネガティブ両イオンモードで検出されるが、微量の異性体は、ネガティブイオンモードでのみ検出されることが確認された。以上のことから多様な糖鎖を分析する場合、ポジティブ及びネガティブ両イオンモードで分析することが重要であることが明らかとなった。

糖鎖配列は、ポジティブ及びネガティブイオンモードで検出されたイオンの自動的 MSⁿ 分析結果を基に解析した。解析例として Fig. 12A 及び B に、ポジティブイ

オンモードによる Man7/D1 及び Man7/D3 の MS/MS スペクトルを示す。 m/z 457²⁺ 及び 913⁺、並びに m/z 619²⁺ 及び 1237⁺ は、Man7/D1 のコア構造の α 1-6 及び α 1-3 結合 Man 鎖が主に開裂することによって生じた Man₃GlcNAcGlcNAc_{ol}(Y_{3a}) 及び Man₅GlcNAcGlcNAc_{ol}(Y_{3p}) である。また、 m/z 538²⁺ 及び 1075⁺ のイオンは、Man7/D3 の α 1-6 及び α 1-3 結合 Man 糖鎖が主に開裂することによって生じた Man₄GlcNAcGlcNAc_{ol}(Y₃) イオンである。 Fig. 12A では、 m/z 619²⁺ 及び 1237⁺、並びに m/z 456²⁺ 及び 913⁺ の相対強度が高く、 Fig. 12B では、 m/z 538²⁺ 及び 1075⁺ の相対強度が高いことが分かる。これらの結果から、15 分及び 17 分に検出された Man7 は、それぞれ Man7/D1 及び Man7/D3 であると推定できた。このように、MS/MS 分析において、構造に由来する特徴的なフラグメントイオンの強度を比較することによって、異性を識別できることが分かった。

シアロ糖鎖の配列解析にはネガティブイオンモードにおける MSⁿ が役立つことが分かった。 TetraNA₄ の MSⁿ スペクトルを、 Fig. 13A (MS² スペクトル、ポジティブイオンモード) 及び 13B (MS⁴ スペクトル、ネガティブイオンモード) に示す。 ポジティブイオンモードでは、糖鎖に特徴的な B イオン、 m/z 454 (B_{2x}⁺)、 657 (B_{3x}⁺)、 1475 (B_{4x}⁺)、 1658 (B₆²⁺)、 B/Y イオン、 m/z 366 (Man-GlcNAc⁺、 Gal-GlcNAc⁺、 GlcNAc-Man⁺)、 527 (GlcNAc-Man⁻ Man⁺、 Gal-GlcNAc-Man⁺、 Man-Man-GlcNAc⁺)、 819 (B₅/Y_{3x}²⁺)、 1513 (B₆/Y_{6x}²⁺)、 1432 (B₆/Y_{5x}²⁺)、 1330 (B₆/Y_{4x}²⁺)、並びに 81 (Gal、 Man)、 101 (GlcNAc) 及び 146 (NeuAc) 間隔の Y イオンが検出された。これに対してネガティブイオンモードの MS² 及び MS³ ではシアロ酸が解離した Y イオンが選択的に検出され、シアロ酸の結合数や分子種などの確認に役立つことが分かった。テトラシアロ糖鎖の MS⁴ では TetraNA₂ に由来する B 及び Y イオンに加え、 m/z 470 (C_{2x}⁻)、 1322 (Z_{6x}²⁻、 [Y_{6x}⁻-H₂O]²⁻)、 1241 (Z_{5x}²⁻、 [Y_{5x}⁻-H₂O]²⁻) 及び 1057 (Y_{5x}⁻/Z_{4x}²⁻、 Y_{4x}⁻/Z_{5x}²⁻、 Y_{4x}⁻/Z_{5x}²⁻、 Y_{5x}⁻/Z_{4x}²⁻、 [Y_{4x}⁻/Y_{5x}⁻-H₂O]²⁻、 [Y_{4x}⁻/Y_{5x}⁻-H₂O]²⁻) などの C 及び Z イオンや、内部開裂イオン及び環開裂イオンと推定されるイオン等、構造解析に有用なフラグメントイオンが検出され、多くの構造情報が得られることが分かった。

同様に、Tri 及び TriNA₃ の分析においても、ポジティブ及びネガティブ両イオンモードにおける MSⁿ 測定によって、糖鎖解析に有用なフラグメントイオンを検出することができた。

以上のように、精密質量分析及び MSⁿ を行うことによって、従来法よりインフォーマティブな糖鎖プロファイリング法を開発することに成功した。また、この糖鎖プロファイリング法を用いた場合、単糖組成を正確に算出できること、ポジティブ及びネガティブイオンモードの切り替えによる連続自動的 MSⁿ 測定によって、一方のイオン化モードではイオン化しにくい糖鎖を見落とすことなく検出し、糖鎖の配列情報が得られることが確認された。そこでつぎに、本分析法を細胞治療用医薬品が発現する糖タンパク質の解析に応用することを目的として、ラット脳由来糖タンパク質を用いて、本分析法の有用

性を検証した。

C.2.2.2 改良型糖鎖プロファイリング法による SDS-PAGE で分離された Thy-1 の糖鎖プロファイリング

目的のタンパク質は、モノクローナル抗体等を用いたアフィニティークロマトグラフィーを含む数段階の過程を経て精製されるのが一般的である。しかし、細胞治療用医薬品においては、目的タンパク質の抗体の入手が困難である場合や、目的タンパク質が極めて微量である場合など、アフィニティー精製が難しいケースが生じることが予想される。最近では、どのような微量タンパク質にも対応できる迅速精製法として、2次元電気泳動が期待されている。本研究では、ラット脳に発現している可溶性 GPI アンカー型タンパク質を細胞発現糖タンパク質のモデルとし、簡単な分画と SDS-PAGE によって分離し、プロテオミクスの方法を用いてタンパク質を同定した後、改良型糖鎖プロファイリング法を使ってゲル内糖タンパク質の糖鎖解析を行なった。

Fig. 14 は、SDS-PAGE によって分離された GPI 結合タンパク質を示している。各バンドを切り出し、ゲル内トリプシン消化によって得られたペプチドの LC/MS/MS を行い、データベース検索を行った。その結果、20-25 kDa のバンドは Thy-1 と同定された。Thy-1 のバンドからゲル内 PNGase F 消化により N-結合型糖鎖を遊離させた後、NaBH₄ で還元し、還元化糖鎖とした。そして、liner ITMS-FT ICRMS を用いて、Thy-1 由来糖鎖のプロファイリングを行った。

Fig. 15 は、ポジティブ(赤色表示)及びネガティブ(青色表示)イオンモードにおける FT ICRMS full MS scan で得られた糖鎖プロファイルの 2D 表示を重ね合わせたものである。この図から、多種類の N-結合型糖鎖が Thy-1 に結合していることが明らかとなった。また、FT ICRMS によって得られた精密質量より、これらの糖鎖の単糖組成を決定することができた。例えば、モノシアロ糖鎖 a (NeuAc₁Hex₆HexNAc₃HexNAc_{ol}、理論分子量: 2095.76) と、ジフコシル糖鎖 b (dHex₂Hex₆HexNAc₃HexNAc_{ol}、理論分子量: 2096.78) のように、NeuAc 1 分子を持つ糖鎖と Fuc 2 分子を持つ糖鎖の場合、分子量差はわずか 1 Da であり、これらの糖鎖が多価イオンで検出されたとき、両者の識別は難しいとされてきた。しかし、高精密かつ高分解能測定が可能である FT ICRMS を用いた場合、Fig. 6 の挿入図に示すように、これら 2 分子は明確に識別され、容易に単糖組成を決定することができた。その結果、Thy-1 に結合する糖鎖の単糖組成は NeuAc₀₋₃dHex₀₋₃Hex₃₋₉HexNAc₁₋₅HexNAc_{ol} と決定された。

Thy-1 由来糖鎖の分析においても、ポジティブまたはネガティブイオンモードのいずれか一方によってのみ検出される糖鎖の存在が確認された。例えば、Hex₃HexNAc₄HexNAc_{ol} (m/z 762²⁺) 及び Hex₅HexNAc₃HexNAc_{ol} (m/z 822²⁺) は、ポジティブイオンモードでのみ検出され、シアロ酸を含む NeuAc₃Hex₆HexNAc₄HexNAc_{ol} (m/z 1440²⁻)、dHex₁NeuAc₂Hex₅HexNAc₅HexNAc_{ol} (m/z 1387²⁻) 及び dHex₂NeuAc₂Hex₆HexNAc₅HexNAc_{ol} (m/z 1542²⁻) は、ネガ

ティブイオンモードでのみ検出された。これらの結果は、両イオンモードの切り換えによる連続分析が有用であることを示すものである。

本分析法を用いた糖鎖プロファイリングの結果、ラット脳 Thy-1 には、ハイマンノース型糖鎖(Man5、Man6、Man7、Man8 及び Man9)、NeuAc 0-3 分子及び Fuc 0-3 分子を含む多数の複合型及び混成型糖鎖が結合していることが分かった。

C.2.2.3 改良型糖鎖プロファイリングによる Thy-1 の糖鎖配列解析

データ依存的 MS/MS スペクトルから、Thy-1 糖鎖の配列を決定した。Fig.16 に、結合位置の異なる 2 分子の Fuc を持つ糖鎖の解析例を、Fig.17 に、結合位置の異なる 2 分子の NeuAc を持つ糖鎖の解析例を示す。

Fig. 16A は、ポジティブイオンモードで測定されたフコースを 2 分子有する 2 本鎖型糖鎖 dHex₂Hex₄HexNAc₃HexNAcol₁ (*m/z* 887.37²⁺、24 分)のプロダクトイオンスペクトルである。2つの Fuc の結合可能位置として、非還元末端側 GlcNAc とトリマンノシルコア構造の還元末端側 GlcNAc が候補として考えられた。Fig.16A では *m/z* 350 (Fuc-GlcNAc⁺、B_{2α}/Y_{5α}⁺)、370(Fuc-GlcNAcol⁺、Y_{1α}⁺) 及び 512(Gal-(Fuc-)GlcNAc⁺、B_{2α}⁺)が検出されていることから、2 分子の Fuc は、非還元末端側の GlcNAc とトリマンノシルコア構造の GlcNAc に結合していることが分かった。

Fuc 以外のその他の特徴として、*m/z* 1553 (Z_{3γ}⁺、[Y_{3γ}-H₂O]⁺)及び 1570 (Y_{3γ}⁺)が検出されていることが挙げられる。これらのイオンは、非還元末端側に未置換の HexNAc が結合していることを示唆している。また、*m/z* 938.03 (Y_{3α/3β}⁺)が検出されたことから、この未置換の HexNAc は、トリマンノシルコア構造の Man 分子にβ1-4 結合する bisecting GlcNAc であることが示唆された。これらの結果から、還元化糖鎖 dHex₂Hex₄HexNAc₃HexNAcol₁ は、Fig.16A 中の図に示すような構造であると推定された。

Fig.16B は、Fuc 2 分子が結合する還元化糖鎖 dHex₂Hex₅HexNAc₄HexNAcol₁ (*m/z* 1069.93²⁺、9 分)のプロダクトイオンスペクトルである。フラグメントイオン、*m/z* 512 (Gal-(Fuc-)GlcNAc⁺、Fuc-Gal-GlcNAc⁺、B_{3α}/Y_{6α}⁺、B_{3α}/Y_{5α}⁺) 及び 1915 (B₆⁺)が検出されたことから、Fuc はトリマンノシルコア構造の GlcNAc には結合していないことが分かった。また、*m/z* 350 (B_{3α}/Y_{5α}⁺)、*m/z* 658 (B_{3α}⁺)、及び *m/z* 1408 (Y_{3β/4α}⁺)を検出したことから、Fuc 2 分子は、非還元末端側の Gal-GlcNAc 構造に Lewis b/y 構造 (Fuc-Hex-(Fuc-)GlcNAc-)の様に結合していることが示唆された。さらに *m/z* 1936 (Y_{4α}⁺)から非還元末端側に未置換の HexNAc が存在することが示唆され、*m/z* 877 (B_{4α}/Y_{5α}⁺、B_{4α}/Y_{6α}⁺)、及び *m/z* 1610 (Y_{3β}⁺)から、この未置換の HexNAc は、部分構造 Fuc-Hex-(Fuc-)GlcNAc-の結合するトリマンノシルコア構造の Man に、3 本鎖構造の 1 分岐構造として結合していることが分かった。これらのことから、還元化糖鎖 dHex₂Hex₅HexNAc₄HexNAcol₁ は、Fig.16B 中の図に

示すような構造であると推定された。

同様に、NeuAc の結合位置をフラグメントイオンから決定することができた。Fig. 17A にジシアロ還元化糖鎖 NeuAc₂dHex₁Hex₅HexNAc₂Hex NAcol₁ (*m/z* 1084.92²⁺、30 分)のプロダクトイオンスペクトルを示す。*m/z* 453 (B_{2α}⁺)、及び 657 (B_{3α}/Y_{5α}⁺、B_{3α}/Y_{6α}⁺)と共に、フラグメントイオン、*m/z* 495 (B_{3α}/Y_{5α}⁺)、948 (B_{3α}⁺)及び 1110 (B_{4α}⁺)が検出されたことから、この糖鎖は、部分構造 NeuAc-Gal-(NeuAc-)GlcNAc-を持つことが分かった。さらに、*m/z* 1799 (B₆⁺)、*m/z* 370 (Y_{1α}⁺)、及び *m/z* 1059 (Y_{3α}⁺、Y_{4α/4β}⁺)が検出されたことから、Fuc はトリマンノシルコア構造の GlcNAc に結合していることが明らかとなった(Fig. 17A 中の図)。

Fig.17B にジシアロ還元化糖鎖 NeuAc₂dHex₁Hex₅HexNAc₃HexNAcol₁ (*m/z* 1186.52²⁺、42 分)のプロダクトイオンスペクトルを示す。*m/z* 454 (B_{2x}⁺)、657 (B_{3x}⁺)、及び 819 (B_{4x}⁺)は検出されたが、フラグメントイオン *m/z* 495 (NeuAc-GlcNAc⁺)、948 (NeuAc-Gal-(NeuAc-)GlcNAc⁺)、及び 1110 (NeuAc-Gal-(NeuAc-)GlcNAc-Man⁺)は検出されなかったことから、NeuAc 2 分子は、共に 2 本鎖型糖鎖の非還元末端側の Gal に結合していることが示唆された。また *m/z* 370 (Y_{1α}⁺)及び 1059 (Y_{4α/4β}⁺)が検出されたことから、Fuc 1 分子は、トリマンノシルコア構造の GlcNAc に結合していることが分かった(Fig.17B 中の図)。

以上のように、FT ICRMS によって得られた精密質量と、liner ITMS のポジティブ及びネガティブ両イオンモード測定によって得られたプロダクトイオンスペクトルをもとに、Thy-1 に結合する多数の N-結合型糖鎖を明らかにすることができた。

C.2.3 糖タンパク質性医薬品の糖鎖部分の構造特性解析のためのストラテジーの開発

ここでは、hCG をモデル糖タンパク質として用いて、糖鎖プロファイリング法、及び本研究とは別に我々が見出したペプチドマッピングを利用した糖ペプチド解析法が、糖タンパク質性医薬品の糖鎖構造解析法として応用可能性であるかを検証するとともに、両分析法を組み合わせた糖タンパク質性医薬品の糖鎖部分の構造特性解析のためのストラテジーを構築した。

C.2.3.1 ペプチドマッピング

ペプチドマッピングは、タンパク質性医薬品の一次構造を確認することを目的として、従来から取り入れられている試験法の一つである。最近では、LC/MS と組み合わせ、MS¹ で得られた分子量や MS² で得られたペプチド配列情報からピークを帰属するのが一般的になっている。この MS² を利用したペプチドマッピングは、プロテオミクスにおけるペプチド同定の定法としても知られている。これは、MS² によってペプチドから生じた b イオン及び y イオンを、データベースに登録されているタンパク質から生じるペプチドに由来する b 及び y イオンの理論値と照合することによって、ペプチドの配列を推定するものである。糖ペプチドの場合は、MS² によって糖鎖部分が優先的に開裂するため、データベースとの照合が難しく、これまで、データベース検索による糖ペ

プチドの同定は難しいとされてきた。しかし、先に我々は、MS² で糖鎖を開裂させて糖鎖構造情報を得、さらに、GlcNAc 結合ペプチドを前駆イオンとして MS³ を行い、生じた b 及び y イオンを利用してデータベース検索することにより、ペプチド配列情報を得られることを見出した。この方法を利用することによって、糖ペプチドの同定はもとより、結合部位毎の糖鎖の構造・不均一性解析が可能になると思われる。そこで我々は、hCG をモデルとして、糖タンパク質性医薬品のペプチドマッピングへの LC/MSⁿ とデータベース検索の応用可能性について検討を行った。

前述したように、hCG は・サブユニット、及び・サブユニットのヘテロダイマーからなる糖タンパク質である。αサブユニットは 92 アミノ酸残基からなり、Asn52 と 78 に N 結合型糖鎖が結合している (Fig. 18)。βサブユニットは 145 アミノ酸残基からなり、Asn13 と 30 に N 結合型糖鎖、並びに Ser121、127、132、及び 138 に O 結合型糖鎖が付加している。酵素消化を完全に行うために hCG を還元カルボキシメチル化した後、トリプシンで消化し、N 結合型糖鎖が結合した 4 つの糖ペプチド (A6、A9、B3、及び B4)、並びに O 結合型糖鎖が結合した 3 つの糖ペプチド (B13、B14、及び B15) を含むペプチド混合物を調製した。

Fig. 19 は、LC/MS によって得られた hCG トリプシン消化物のペプチドマップである。ここではポジティブイオンモードでフル MS¹ スキャン、インソース CID、及びデータ依存的 MS^{2/4} 測定を行った (Table 6)。尚、インソース CID とは、イオン化してから検出器に導入されるまでの間に気体を衝突させてイオンを開裂させる方法である。また、データ依存的 MSⁿ では、MSⁿ⁻¹ の各スキャンで最も強く検出されたイオンを前駆イオンとして自動的に MSⁿ を行った。Fig. 19 は MS¹ のトータルイオンクロマトグラム (TIC) で、ペプチド及び糖ペプチドに由来するピークが表れている。Fig. 19B は、インソース CID によって生じた糖鎖に特徴的な GlcNAc の B イオンのみを抜き出したクロマトグラムで、主に糖ペプチドに由来するピークが表れている。これらの糖ペプチドの配列を推定するために、タンパク質データベース解析エンジン TurboSEQUENT を用いて、得られたマススペクトルとタンパク質データベース NCBInr に登録されているタンパク質の照合を行った。その際に、糖ペプチドの同定を可能にするため、検索条件に Asn、Thr、及び Ser に GlcNAc が結合している可能性を追加して検索した。その結果、Fig. 19B の 19-22、20、及び 53 分に溶出されたピークは、GlcNAc が結合したペプチド A9、A6 及び B4 と帰属された。また、3、22-27 及び 32-35 に溶出されたピークは、ペプチド B13、B3 及び B15 と同定された。これらのペプチドからは糖鎖が完全に脱離したペプチドイオンが生じたため、データベース検索上では糖ペプチドとして特定されなかったが、MS² スペクトル上に糖鎖に特徴的なイオンが検出されることから、糖ペプチドと判定した。26 分のピークは、データベース検索によって同定されなかったが、MS² スペクトルを解析した結果、B14 であることが推定された。このペプチドには糖鎖が 2 本結合しているため、データベース検索では同定できなかったものと思

われる。

各ペプチドに結合している糖鎖の構造は、MS² スペクトルから推定した。Fig. 20 は 7 つの糖ペプチドの典型的な MS² スペクトルと、その帰属結果を示している。A-D は N 結合型糖鎖が結合した A6、A9、B3、及び B4 で、E-G は O 結合型糖鎖が結合した B13、B14、及び B15 である。N 結合型糖鎖は、混成型及び複合型糖鎖で、O 結合型糖鎖は、シアル酸が結合した 3-4 糖からなる糖鎖であることが確認された。

C.2.3.2 糖鎖プロファイリング

糖タンパク質性医薬品の糖鎖部分の恒常性を評価するため、遊離糖鎖のプロファイリングが糖鎖試験として設定されることが多い。これまでは、2-AP や 2-アミノベンザミドによる糖鎖の標識と HPLC によるプロファイリングや、HPAEC-PAD によるプロファイリングが取り入れられてきた。ここでは、hCG の N 結合型糖鎖を用いて、我々が開発した LC/MSⁿ に基づく糖鎖プロファイリング法 (Table 7) の応用可能性を検証した。

Fig. 21A 及び B は、ポジティブ及びネガティブイオンモードのフル MS¹ スキャンによって得られた糖鎖プロファイルである。各ピークの糖鎖配列は、MS¹ によって測定された分子量及び MS² スペクトルから解析した。糖鎖配列解析の一例として、Fig. 22 に 37 分に溶出された糖鎖の MS² スペクトルを示す。一連の B イオンシリーズ、及び Y イオンシリーズが検出され、シアル酸が結合した複合型糖鎖と推定された。

以下同様に主なピークの MS² スペクトルを解析した結果、hCG の主な糖鎖の構造はシアル酸結合混成型及び複合型 2 本鎖と推定され、ペプチドマッピングの結果とよく一致した。さらに、2 本鎖糖鎖に加えて、ペプチドマッピングでは検出されなかったトリシアロ 3 本鎖型糖鎖が検出された。糖鎖プロファイリングは糖鎖の詳細な解析に適していることが示唆された。

C.2.3.3 糖タンパク質性医薬品の糖鎖の構造特性解析のためのストラテジー

hCG を用いた実験により、LC/MSⁿ システムを用いたペプチドマッピングと糖鎖プロファイリングによって、部位毎の糖鎖の概略、糖鎖の詳細構造、及び不均一性が明らかになることが確認された。この 2 つの手法を用いることによって、分子内に複数の糖鎖結合部位を持つ糖タンパク質の構造解析や、類似糖タンパク質の同定性・同質性評価が可能になることが予想される。

Fig. 23 は、LC/MSⁿ を利用した糖タンパク質性医薬品の糖鎖に関する構造特性解析の流れを示したものである。まず、酵素消化を完全に行うため、糖タンパク質は予め還元カルボキシメチル化する。サンプルを 2 つに分け、一方をトリプシン等でペプチドに断片化する。このとき、LC/MS² に適したサイズのペプチド、すなわち C18 カラムに保持される程度の疎水性を持ち、MS² が可能な分子量で、かつ、分子内に糖鎖を 1 分子しか含まないペプチドが得られるように消化酵素を選択するのが望ましい。Lys-C、Glu-C、または Asp-N やそれらの組み合わせも検討する。そして、得られたペプチド断片の LC/MSⁿ を行う。

つぎに、ペプチドマップで得られたデータを基に、以下の手順で糖ペプチドを解析する。まず、すべてのペプチド・糖ペプチドのマススペクトルデータを使ったデータベース検索を行い、ペプチド及び糖ペプチドの配列を推定する。このとき、データベース検索エンジンの検索条件に糖鎖付加の可能性を追加する。つぎに、MS² スペクトルの中から、糖鎖に特徴的なイオンを指標にして糖ペプチドを選別する。その中で既にデータベース検索エンジンによって同定された糖ペプチドは、MS²⁻⁴ スペクトルから糖鎖構造を推定する。データベース検索で同定されなかった糖ペプチドについては、MS² スペクトル中の各プロダクトイオンを帰属してペプチド関連イオンを探し出し、マニュアルでペプチド配列と糖鎖配列を推定する。

残りの還元カルボキシメチル化糖タンパク質には PNGaseF を作用させて N 結合型糖鎖を遊離させる。LC/MS を用いた糖鎖プロファイリングを行い、糖鎖構造を詳細に解析する。両者を比較し、構造特性を明らかにする。

我々は、本ストラテジーが、今回用いた hCG だけでなく、ラットやマウス組織中の微量糖タンパク質の構造特性解析に応用可能であることを確認している。このストラテジーは糖タンパク質性医薬品の特性解析・品質評価のみならず、開発段階の微量糖タンパク質や不純物、並びにバイオジェネリック等の糖鎖解析にも応用可能と期待される。

C.2.4 考察

これまで我々は LC/MS を用いた独自の糖鎖プロファイリング法を開発し、様々な糖タンパク質の糖鎖解析に利用してきた。本研究では、糖タンパク質性医薬品の特性解析、同等性・同質性等の評価に利用することを目的として、糖鎖プロファイリング法の改良と、その応用可能性の検証を行った。

まず平成 15 年度は、安定同位体標識法と LC/MS を組み合わせた単糖組成分析法及び定量的糖鎖プロファイリング法を開発し、MS の課題である再現性を向上させることができた。

つぎに平成 16 年度は、糖鎖プロファイリングにおいて、ポジティブ及びネガティブ両イオンモードで精密分子量測定及び MSⁿ 測定を行うことによって、従来よりも多くの糖鎖構造情報が得られることを実証した。この方法を、SDS-PAGE で分離されたゲル内糖タンパク質の糖鎖解析に応用し、ラット脳の GPI アンカー型タンパク質 Thy-1 の構造特性を明らかにすることができた。改良型糖鎖プロファイリングは、電気泳動で分離された微量糖タンパク質の糖鎖解析にも役立つことが確認され、糖タンパク質性医薬品はもとより、細胞治療用医薬品が発現する糖タンパク質の糖鎖解析にも応用可能であることが示唆された。

平成 17 年度は、hCG をモデル糖タンパク質として用いて、糖タンパク質性医薬品の特性解析における糖鎖プロファイリング法、並びに本研究とは別に我々が見出した LC/MS とデータベース検索を組み合わせた糖鎖構造解析法の応用可能性を検証した。両分析法を利用することによって、短時間で hCG の詳細な糖鎖構造

や、部位特異的糖鎖不均一性を明らかにできることを確認し、これらの方法を取り入れた糖タンパク質の糖鎖部分に関する構造特性解析のためのストラテジーを構築した (Fig. 23)。この解析手法は、糖タンパク質性医薬品が抱える課題、すなわち糖鎖構造解析、糖鎖試験、同等性・同質性やバイオジェネリックの糖鎖部分の評価などに利用できると思われる。

C.3 新規医薬・療法の現状と展望

C.3.1 抗体医薬の現状と展望

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ガンマグロブリン製剤が開発され老人や術後の患者の日和見感染症、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、対象となるターゲットに対して高親和性と特異性の高いマウスモノクローナル抗体について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かもしれない、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。そこで今日までに、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、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医薬品として承認され臨床で用いられており、現在臨床応用を目指して開発中のものも多い (Table 8, Table 9)。そこで本研究においては抗体医薬の基礎と臨床応用、問題点等について調査および研究を行なった。

C.3.1.1 抗体医薬の作成

C.3.1.1.1 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定常 constant (C) 領域をヒト抗体の C 領域に置き換えたものである。さらに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相補性決定領域 complementarity determining region (CDR) の 1 から 3 を残して、それ以外の部分であるフレーム領域 frame region (FR) を全てヒト抗体に置き換えたものである。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。

第一のステップは、マウス抗体産生ハイブリドーマか