

タンパク質の糖鎖修飾は小胞体を経てゴルジ体で行われるが、小胞体での糖鎖修飾過程はヒトと植物で共通である。そのため、小胞体に組換えタンパク質を局在化させ、ゴルジ体での糖鎖修飾がおこらないようにすることで植物糖鎖の付加を回避しようという試みが行われている。哺乳類では小胞体へのタンパク質局在にはタンパク質の C 末端にある小胞体局在化配列 (HDEL あるいは KDEL) が働くことが知られているが、植物においても同様である。抗体の L 鎖および H 鎖の C 末端に KDEL 配列を付加することにより、発現されたタンパク質が小胞体に蓄積され、ほぼ 90%の糖鎖をハイマンノース型にすることができたと報告されている^{27, 28)}。

植物の小胞体への局在により糖鎖をハイマンノース型のみにした抗体は、小胞体に局在化させずに生産した抗体と比べて、マウスに投与した際の血中半減期が短いことが報告されており、マクロファージにあるマンノース受容体を介した取り込みと分解を受けやすいと考えられている^{29, 30)}。抗体の半減期が短いことは場合によっては利点があるとされ、たとえば、狂犬病の治療のようにワクチンと抗体を同時に投与するような場合は、抗体の半減期が短いことでワクチンの効果が阻害されずに済むのでよいとされている³⁰⁾。

C. 4. 6. 2 植物特異的糖鎖を合成する酵素の欠損

ヒトにない糖鎖構造である β 1-2 キシロースと α 1-3 フコースの付加を回避するため、 β 1-2 xylosyltransferase と α 1-3 fucosyltransferase を欠損させることが試みられている。ウキクサでは RNAi によるこれらの酵素の発現抑制が試みられ、コケやシロイヌナズナではこれらの

酵素遺伝子をノックアウトした株が作成されている³¹⁻³³⁾。これらの系ではヒトに対して免疫原性を示す糖鎖付加のない組換えタンパク質を作ることが可能と考えられる。

近年のバイオ医薬品開発の主流となっている抗体医薬品では、Fc γ R を介した抗体依存性細胞障害活性 (Antibody-dependent cellular cytotoxicity: ADCC) が薬効発現において重要なものが多い。抗体の ADCC 活性には Fc 領域にある N 結合型糖鎖の構造が影響することが知られており、還元末端の N アセチルグルコサミンに結合する α 1-6 フコースを欠損させると ADCC 活性が高くなることが知られている^{34, 35)}。 α 1-3 フコースと β 1-2 キシロースを付加しないように改変されたウキクサやコケの発現系で生産された抗体では、動物細胞で生産された α 1-6 フコースを持つ抗体と比較して、30~40倍高い ADCC 活性を示したことが報告されている^{30, 31, 36)}。

C. 4. 6. 3 ヒト型の糖鎖合成に関わる酵素等の発現

多くのヒトタンパク質の糖鎖には末端にシアル酸が結合しており、医薬品として有用なタンパク質ではシアル酸がタンパク質の血中濃度の維持に重要であるものが多い。例えばエリスロポエチンの血中半減期は、シアル酸が結合しているものが 5~6 時間であるのに対して、シアル酸を除去したものでは 2 分と、シアル酸の有無で大きな差がある³⁷⁾。ただし、抗体に結合した糖鎖のようにシアル酸含量が少なく、おそらく糖鎖がタンパク質の内側に向いているためにシアル酸の体内動態への影響が小さいものもある。

シアル酸の付加された糖鎖が合成されるためには、シアル酸の合成、活性化、輸送、転移

が必要であるが、植物はこれらに関与する酵素を持たない。そのため、植物で発現させた糖タンパク質糖鎖にシアル酸を付加させるためには、(i)GlcNAc から ManNAc を合成する UDP-GlcNAc 2-epimerase、(ii)ManNAc から NeuAc を合成する NeuAc synthase、(iii)NeuAc を活性化する CMP-NeuAc synthase、(iv)CMP-NeuAc をゴルジ体に輸送する CMP-NeuAc transporter、(v)NeuAc を糖鎖に付与する sialyltransferase、という 5 つの酵素を、細胞内の適切な局在部位に発現させる必要がある。これらのうち、epimerase 以外は植物細胞で発現させた例が報告されている³⁰⁾。

C. 4. 7 考察

組換えタンパク質医薬品のヒトに対する免疫原性は、動物を用いた非臨床試験で評価することが極めて困難であることから、安全性評価において常に懸念されながらも、臨床試験実施前あるいは市販前に十分な知見を得られないのが現状である。植物糖鎖の場合は、ヒトタンパク質に結合している場合の免疫原性は不明ながら、ヒトに対する植物アレルゲンにおけるエピトープとなり得ることが明らかであることから、組換えタンパク質の糖鎖の構成要素としては回避すべきものであろう。ただし、食物として摂取する植物由来タンパク質にもこれらの糖鎖は含まれているため、組換えタンパク質を経口投与する場合は、これら植物糖鎖に対する IgE を有する患者を除いては問題ない可能性も考えられる。従って、現段階での解釈としては、植物で発現させた糖タンパク質にはヒトに対して免疫原性を示す糖鎖が付加されているものの、経口投与の場合は、食物として摂取していて問題がない患者に対しては許容さ

れるが、非経口投与、特に注射剤としての投与の場合は、ヒト型糖鎖が結合するような製造系を確立する必要がある、と考えるのが妥当であろう。欧米のガイドラインにおける植物糖鎖関連の記載を Table 5 に示した。植物に特有の糖鎖構造に対する配慮が必要であることが述べられており、植物糖鎖を含む場合は安全性への影響を説明するよう求められている。

糖鎖は有効性・安全性への影響のみならず、タンパク質性医薬品の品質の一定性確保の点でも重要である。糖鎖の構造は多様であり、同一タンパク質分子内でも異なる部位に結合している糖鎖の構造は異なる場合がほとんどであり、また、同一のタンパク質の同一の糖鎖結合部位でもタンパク質分子ごとに結合している糖鎖の構造は変わり得る。さらに、このような糖鎖の不均一性は、組換えタンパク質を生産する工程中の種々の要因により変動することから、糖鎖構造の不均一性を一定に保ち、恒常性を維持することが糖タンパク質医薬品の品質の一定性確保の上で重要である。

組換えタンパク質医薬品の製造に多くの実績がある動物細胞の発現系においても、血清や培養条件など種々の要因でタンパク質に付加される糖鎖構造が変動し、糖鎖構造を人工的に完全に制御することは困難である。トランスジェニック植物を用いて糖タンパク質を生産する場合にも、品質に関して動物細胞を生産宿主とする場合と同様の配慮が必要であるが、たとえばタバコを用いた組換えタンパク質の生産では、細胞内での局在部位ごとに付加される糖鎖構造が異なることに加えて、同一の植物体においても、若い葉と古い葉では糖鎖修飾パターンが異なると報告されており^{38, 39)}、動物細胞以上に変動幅が大きい可能性もある。特に、糖鎖構造の改変（ヒト型化）を目指して糖転移酵

素を発現させた例では、目的とする反応が十分進まずに不均一性がより高くなる例も報告されていることから、品質の一定性確保の点で特に注意が必要であろう^{40, 41)}。

組換えタンパク質医薬品の開発においては、目的タンパク質の特性と生産コストなどの実用面の要素を考えて生産宿主が選択される。生産宿主として植物が適している組換えタンパク質としては、経口投与されるものや、低コストでの生産が実用化のために重要であるものがまず挙げられるであろう。非経口投与される糖タンパク質の生産宿主としてトランスジェニック植物が利用されるには、糖鎖構造の点で改良が必要であると考えられるが、近年多くの品目が開発されているモノクローナル抗体は、トランスジェニック植物による生産が可能と考えられている糖タンパク質の一つである⁴²⁾。その理由としては、抗体ではほとんどの製品で糖鎖修飾がFc部分のN結合型糖鎖1か所のみであること、糖鎖の機能におけるシアル酸の重要性が低いとされていること、還元末端のNアセチルグルコサミンに結合したフコースが存在しない方がADCC活性が高く植物に特異的な糖鎖の除去のみで医薬品として適した抗体が作製できると考えられること、投与量が高いために生産コスト削減の必要性が高いこと等が挙げられる。

2007年にはトランスジェニック動物(ヤギ)の乳汁中に発現させたアンチトロンビンⅢ(ATryn[®])がEUで承認され、トランスジェニック動植物を用いた医薬品製造が現実のものとなってきた。新世代バイオ医薬品の一面をなすものとして、トランスジェニック植物を用いて生産された組換えタンパク質医薬品についても、品質・安全性確保のための方策を確立していく必要がある。

C.5 バイオ医薬品の品質・安全性評価に関する研究

—抗体医薬品等の先端バイオ医薬品の安全性確保—

C.5.1 抗体医薬品とサイトカイン放出症候群

TGN1412に関する各種の資料から、TGN1412の臨床試験で生じたサイトカイン放出症候群は、次のようなものであったと考えられる。

(1) TGN1412の開発では、過去の知見に基づき、サイトカイン放出症候群発生のリスクに関する配慮はなされていたものの、動物とヒトでの標的分子との親和性の差や反応性の相違が十分考慮されず、CD28の占有率が90%にもなる用量が投与された結果、生理的に制御が可能な範囲を超えてT細胞やエフェクター細胞が活性化され、重度のサイトカイン放出症候群が生じたと推察される。(下記C.5.1.1~C.5.1.6参照)

(2) 臨床試験後に、TGN1412をプレートへ固定化することにより*in vitro*でTGN1412の生物活性を検出できる試験系が確立された。確立された試験法を用いた検討により、ヒトとカニクイザルのリンパ球ではTGN1412への反応性に相違があり、カニクイザルのリンパ球ではTGN1412単独の刺激では細胞増殖やサイトカイン産生が起こらないことが示された。また、ヒトリンパ球では、TGN1412の薬理作用である細胞増殖と、有害作用である炎症性サイトカイン放出が同じ濃度領域で検出された。これらのことから、非臨床試験の段階でTGN1412の生物活性について、ヒトやサルの細胞を用いた適切な試験系による解析が行われていれば、臨床試験での有害事象発生を予測

できた可能性もあると考えられる。(下記 C. 5.1.7 参照)

これらの考察に基づき、T 細胞を活性化する作用を持つ抗体医薬品、あるいは、Fc γ 受容体を介してエフェクター細胞を活性化する作用を持つ抗体医薬品では、今後もサイトカイン放出症候群に対する慎重な対応が必要であると考えられる。また、バイオ医薬品の安全性を考える上では、医薬品の生物活性や薬理作用に対する理解を深めることが重要であり、臨床での薬効や毒性を予測するためには、ヒト細胞や組織を用いた試験系の利用・開発が有効であると考えられる。

以下に、これらの考察の根拠となる知見を紹介する。

C. 5. 1. 1 TGN1412 の特性

TGN1412 は、ヒト化抗ヒト CD28 抗体で、T 細胞表面分子 CD28 に結合する。サブクラスは IgG4。T 細胞が抗原提示細胞から抗原提示を受けて活性化されるには、T 細胞受容体 (TCR) が抗原を認識すると共に、抗原提示細胞上の B7 (CD80, CD86) と T 細胞上の CD28 が結合し、CD28 を介した補助シグナルが惹起されることが必要である (Fig. 4, 5) ⁴³⁾。TGN-1412 は、アゴニスト活性を持つことが大きな特徴であり、生理的な T 細胞活性化経路とは異なり、単独で CD28 を介して T 細胞を活性化することができる^{44, 45)}。

TGN-1412 の適応疾患としては、B 細胞性慢性リンパ性白血病 (B-CLL) と関節リウマチが考えられていた ⁴⁶⁾。T 細胞の数と機能が低下している B-CLL においては、TGN-1412 による T 細胞の増殖と活性化の促進、および、CD40/CD40L 経路を介して間接的に B7 の発現を増強することにより、B 細胞リンパ腫の抗

原提示能を改善し、腫瘍特異的 T 細胞の誘導を促すことによって奏功するとされていた。一方、関節リウマチでは、IL-4、IL-10 などの抗炎症性サイトカインの誘導と、自己反応性 T 細胞をコントロールし得る調節性 T 細胞の増殖により奏功するとされていた。これら、CD28 の活性化により疾患を治療するというコンセプトは新規なものであり、臨床試験を経て、その有用性が示されていくはずであった。

C. 5. 1. 2 TGN1412 の臨床試験

健常人を対象とした TGN1412 の初回臨床試験は、2006 年 3 月 13 日、ロンドンの Northwick Park 病院で行われた。0.1mg/kg の TGN1412 を静脈内投与された被験者 6 人全員に重度のサイトカイン放出症候群が生じ、多臓器不全に陥った。症状は極めて重篤であったが、主として免疫抑制を目的とした投薬 (hydrocortisone、methylprednisolone、抗 IL2 受容体抗体 daclizumab 等) と、血液透析、血漿交換などの処置により救命された ⁴⁷⁾。

血液検査の結果では、全ての患者で投与 4 時間後までに、TNF α の急激な増加と、それに続く IL-2、IL-6、IL-10、IFN γ 等の増加が認められている (Fig. 6) ⁴⁸⁾。サイトカイン放出は、hydrocortisone や methylprednisolone の投与により改善され、ほぼ 3 日以内に低値になっている。また、TGN1412 投与直後から重度の血小板減少、リンパ球減少、単球減少が認められており、CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ T 細胞は、投与 24 時間後まで測定限界以下となっている ⁴⁷⁾。

C. 5. 1. 3 TGN1412 臨床試験の問題

TGN1412 の臨床試験後、目的の構造や生物活性を持つタンパク質が作られていたか、汚染

物質の混入はなかったか等について、あらためて治験薬の品質を確かめる試験が行われた (Table 6)。その結果、試験結果に問題はなく、エンドトキシン、発熱性物質、微生物その他の混入は認められなかったとされ、事故の原因は、品質特性解析や非臨床試験では予測されなかった TGN1412 の生物学的な作用にあったとされた⁴⁸⁾。

非臨床試験結果から予測されなかった有害事象がヒト初回投与試験で生じた原因としては、用量と投与方法が適切でなかった可能性が指摘されている^{49, 50)}。TGN-1412 の初回臨床投与量は、FDA ガイダンス案“Estimating the safe starting dose in clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers”を参考に、最大無毒性量 (No Observed Adverse Effect Level : NOAEL) を基準に決定された⁴⁶⁾。すなわち、カニクイザルを用いた 28 日間反復投与実験の高用量群に投与された 50mg/kg を NOAEL とし、allometric correction factor として 3.1 を用いて human equivalent dose (HED) を 16mg/kg、safety factor として 160 を用いて、0.1mg/kg と算出されている。しかし、TGN1412 を投与されたカニクイザルでは低用量群、高用量群ともに、炎症性サイトカイン IL-6 の濃度上昇がみられているため (Table 7)、これが薬理作用でなく有害作用であると考え、NOAEL を 50mg/kg としたことが適切でなかった可能性も考えられる⁴⁹⁾。さらに、ヒトとカニクイザルにおける TGN1412 と CD28 の親和性や反応性の差異に関する記載がないことから、用量設定のための試験系や結果の解釈が妥当でなかった可能性は否定できないであろう。

投与方法に関して、治験計画では、short-term infusion により TGN1412 を投与

するとされており、2mg/ml に希釈した製剤を 1~5ml/min で投与することとされているため、0.1mg/kg を体重 70kg のヒトに投与する場合は、0.7~3.5 分で投与するプロトコールとなっていた⁴⁶⁾。一方、カニクイザルを用いた実験では、1 時間以上をかけて点滴静注するプロトコールとなっている⁴⁶⁾。非臨床試験と臨床試験で異なる投与方法が採用された理由は不明であるが、抗体医薬品によるサイトカイン放出症候群は、注入速度に依存して起こりやすいことが知られているため⁵¹⁾、投与速度が高すぎたことがサイトカイン放出症候群が起こった原因の一つである可能性も考えられる。

C. 5. 1. 4 抗体医薬品の有害反応としてのサイトカイン放出症候群

サイトカイン放出症候群は、抗体医薬品による有害反応の一つとして認識されていたリスクであるが、通常は軽度~中程度であり、抗炎症薬や解熱薬の投与、あるいは、投与量の漸増、投与速度の制限などによりコントロールされている^{51, 52)}。しかし、稀に重度のサイトカイン症候群が生じることがあり、抗 CD3 抗体 Muromonab-CD3、抗 CD20 抗体 Rituximab、抗 CD52 抗体 Alemtuzumab では、サイトカイン放出症候群による死亡例が報告されている^{52, 53)}。

抗 CD3 抗体 Muromonab-CD3 により生じるサイトカイン放出症候群には、

◆CD3 および Fcγ 受容体との結合を介した T 細胞の活性化

◆Fcγ 受容体との結合を介したエフェクター細胞の活性化

の 2 つの機構が関与していると考えられている⁵⁴⁻⁵⁷⁾。

Muromonab-CD3 は、T 細胞受容体複合体

の構成要素である CD3 に結合し、T 細胞受容体をインターナリゼーションさせることにより T 細胞の活性化を抑制するが、CD3 に結合した際、一時的に T 細胞を活性化し、サイトカイン放出を起こすことが知られている⁵⁶⁾。すなわち、Muromonab-CD3 は目的外の作用としてアゴニスト活性を併せ持つ抗体であると言える。Muromonab-CD3 は Fc 部分を介して Fc γ 受容体とも結合する。Fc γ 受容体との結合は、CD3 のクロスリンクによる T 細胞活性化に関与すると共に、Fc γ 受容体を発現しているエフェクター細胞の活性化も引き起こす。活性化されたエフェクター細胞からもサイトカインが放出されるため、T 細胞とエフェクター細胞から放出されたサイトカインにより、サイトカイン放出症候群が生じると考えられている⁵⁸⁾。Muromonab-CD3 の初回～第 3 回の投与時には、ほとんど全ての患者でインフルエンザ様症状を示す軽度のサイトカイン放出症候群が起こるとされている⁵⁸⁾。腎移植の急性拒絶反応の臨床試験においては、Muromonab-CD3 投与後、サイトカイン放出が関与すると考えられる致死的な肺浮腫が生じた割合は、2% 以下であった⁵⁸⁾。Muromonab-CD3 は臓器移植の際の免疫抑制に用いられるため、他の免疫抑制薬が併用される場合が多いが、methylpredonisolone の前投与を受けなかった患者で、TNF α の上昇がより顕著となる傾向がある⁵⁹⁾。

一方、抗 CD20 抗体 Rituximab および抗 CD52 抗体 Alemtuzumab により生じるサイトカイン放出症候群には、

◆Fc γ 受容体との結合を介したエフェクター細胞の活性化
が関与しているとされている^{60, 61)}。すなわち、活性化されたエフェクター細胞から放出され

るサイトカインにより、サイトカイン放出症候群が生じると考えられている。これらの医薬品ではサイトカイン放出症候群は infusion reaction の一因としての位置付けとなっており、infusion reaction が生じた例のうち、どの程度がサイトカイン放出が関与するものかは不明であるが、発熱等の infusion reaction が生じる頻度は、Rituximab では約 90%⁶²⁾、Alemtuzumab では 83%⁶³⁾とされている。いずれも致死的な infusion reaction が起こる頻度は高くない。

C, 5. 1. 5 TGN1412 の開発過程で、サイトカイン放出症候群に対する配慮がなされていたか

上記の知見から考えると、

◇T 細胞を活性化しない

◇Fc γ 受容体と結合しない (エフェクター細胞を活性化しない)

ことが、抗体医薬品投与に伴うサイトカイン放出症候群の回避につながると思われる。

TGN1412 の薬効発現においては T 細胞を活性化することが重要であるため、T 細胞の活性化作用をなくすことはできない。しかし、Muromonab-CD3 を投与されたチンパンジーで TNF α と IFN γ を含めた炎症性サイトカインの放出が起こったことが報告されている⁶⁴⁾のに対して、TGN1412 を投与されたカニクイザルでは TNF α および IFN γ の放出が検出されなかったことを根拠として、TGN1412 の開発過程では、TGN1412 の T 細胞活性化作用はサイトカイン放出症候群につながらないと判断されていた⁴⁶⁾。

TGN1412 の薬効発現においてエフェクター細胞の活性化は不要であるので、Fc γ 受容体との結合はなくてもよいはずである。すなわち、

血中半減期が短くなるという問題は生じるが、Fc ドメインを持たない F(ab')₂ として開発することも一案であったと思われる。しかし、Investigational Medicinal Product Dossier には、TGN1412 の生物活性発現には、Fc/Fc 受容体を介した CD28 のクロスリンクが必要であり、Fc 部分を除いた F(ab')₂ では T 細胞の増殖が起こらなかったと記載されている (Fig. 7) ⁶⁵⁾。

TGN1412 の場合、Fc ドメインが必須であるとしても、エフェクター細胞の活性化作用は極力ないことが望ましい。この点について、IgG のサブクラスとして、エフェクター活性の低い IgG4 を選択している点では、配慮はされていたと考えられる。治験薬概要書には、TGN1412 の IgG1 バリエーションである TGN1112 と TGN1412 について、エフェクター活性を比較した結果が記載されている (Table 8)。この試験では、サイトカイン放出症候群を起こすことが知られている Alemtuzumab をポジティブコントロールとして用いて両抗体の ADCC 活性と CDC 活性が検討されており、TGN1412 は ADCC 活性、CDC 活性を示さず、TGN1112 は ADCC 活性を示したと記載されている。一方、薬理活性は TGN1112 の方が高かったと記載されている。したがって、目的外の作用である ADCC 活性を持たないことを重視して、あえて薬理活性の低い TGN1412 を選択したと考えることができる。

以上のことから考えると、TGN1412 の開発過程では、過去の知見に基づいてサイトカイン放出症候群への配慮はなされたものと思われる。ただ、治験薬概要書にある「5mg/kg の TGN1412 を投与されたカニクイザルでのサイトカイン上昇がわずかであったため、第 1 相臨床試験において、0.1~5.0mg/kg の用量で

サイトカイン放出症候群が起こるとは想定されない。」との記載からは、サルとヒトで TGN1412 への応答性に違いがある可能性に関する配慮が感じられず、リスクに対する認識が十分ではなかった可能性が伺われる。また、TGN1412 の作用に Fc 部分が必要であることや、TGN1412 を投与された被験者で血中 TNF α 濃度が非常に急激な増加を示したことから、サイトカイン放出には T 細胞以外の細胞 (エフェクター細胞) も関与していた可能性が考えられる ⁶⁶⁾。

蛇足ながら、Muromonab-CD3、Rituximab、あるいは Alemtuzumab ではサイトカイン放出症候群を回避することができるかどうかであるが、Muromonab-CD3 の場合は構造改変による回避が可能、Rituximab、Alemtuzumab に関しては回避が難しいと考えられる。Muromonab-CD3 の作用においては、CD3 および Fc γ 受容体との結合を介した T 細胞の活性化や Fc γ 受容体との結合を介したエフェクター細胞の活性化は不要であるため、Fc γ 受容体との結合活性を減じた改変体が開発されており、臨床試験でサイトカイン放出症候群の発生頻度を低下させることができたと報告されている ⁵⁷⁾。一方、Rituximab や Alemtuzumab では、標的細胞を障害することが薬効発現において重要であるため、サイトカイン放出を伴うエフェクター細胞の活性化は薬理作用の一部である。したがって、これらの場合は、抗炎症薬や解熱薬の前投与などにより、放出されたサイトカインの全身への影響を少なくする等の工夫をすることで、対処せざるを得ない。Rituximab や Alemtuzumab に限らず、開発中のものを含めて、腫瘍細胞等を標的とする抗体医薬品ではエフェクター細胞の活性化が重要であることが多いため、そのよう

な抗体医薬品では常にサイトカイン放出症候群に対する注意が必要であると思われる。

C. 5. 1. 6 TGN1412 により生じたサイトカイン放出症候群の特徴

TGN1412 で生じたサイトカイン放出症候群で特に際立った特徴は、早期の肺障害と著明なリンパ球減少であるとされている⁴⁷⁾。全ての患者でみられた早い段階からの肺の障害は異常で、肺に特異的な免疫反応が起こった可能性もあり、TGN-1412 の肺への直接作用とサイトカインの作用があいまって、このような早期の肺障害が起こった可能性も考えられている⁴⁷⁾。また、リンパ球減少は他の抗体医薬品で生じたサイトカイン放出症候群でも見られているが、TGN1412 の場合は特に顕著であるとされている⁴⁷⁾。TNF α などのサイトカイン放出がおこる敗血症では、数日にわたってリンパ球が減少する場合があるが、B 細胞と CD4⁺ T 細胞に特異的であるのに対して、TGN1412 投与後は、8 時間以内という早い段階でリンパ球減少がおこっていること、CD4⁺ T 細胞、CD8⁺ T 細胞、単球のいずれもが減っていることから、サイトカインの影響のみでなく、TGN-1412 そのものの作用によって、リンパ球の死滅あるいは他の組織への移行などのために、リンパ球減少が生じた可能性も考えられている⁴⁷⁾。

TGN1412 投与後の症状と、他の抗体医薬品の投与で生じた症状を比較すると、急激な TNF α 濃度の上昇、続く IFN γ 、IL-6 の上昇、その後の心血管系の症状と播種性血管内凝固は、他の抗体医薬品で生じたサイトカイン放出症候群と共通である一方で、早期の肺障害の他、広汎性の紅斑と後の表皮落屑、神経系の後遺症、回復後の筋肉痛は、TGN-1412 に特有であるとされている⁴⁷⁾。

通常、抗体は血液脳関門を透過しないため、神経系の後遺症との関連は不明であるが、治験薬概要書には、TGN-1412 の交差反応性を調べた結果、ヒトとカニクイザルの脳、脊髄、および、下垂体のアストロサイトが染色されたと記されている。この交差反応性の TGN1412 の安全性への影響については、カニクイザルへの反復投与試験で中枢神経系に関する所見が認められなかったことを根拠に、問題はないとされていた。また、この他に、カニクイザルの子宮頸部（上皮細胞）、ヒトの胎盤（栄養膜細胞層）が TGN1412 によって免疫染色されたと記されているが、これらはいずれも結合部位は細胞内であるとされ、*in vivo* では標的とならず、安全性上の懸念事項にはならないとされていた。これまでに得られた情報からは、これらの判断が適切であったか否かは明らかではないが、ヒトの組織・細胞パネルを用いた抗体医薬品の交差反応性の検証は、安全性に関する重要な情報を与え得るため、非臨床試験の一つとして推奨されるものであると考えられる。

C. 5. 1. 7 臨床試験後に実施されたヒト細胞を用いた TGN1412 の生物活性評価

初回臨床試験での有害事象発生後、TGN1412 の生物活性について、ヒトおよびカニクイザルのリンパ球を用いた *in vitro* 実験による検証が National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC) により行なわれ、その途中経過が TGN1412 の事故原因の検証にあたった専門家グループ (Expert Scientific Group) の報告書に記載されると共に⁴⁸⁾、最近、最終結果が論文としても報告された⁶⁷⁾。NIBSC の検討で明らかになった主な点は、(1) TGN1412 の作用を *in vitro* で検出するには、TeGenero 社で実施されてい

た方法とは異なり TGN1412 を固定化することが必要で、TGN1412 を固定化した条件ではヒトリンパ球からのサイトカイン放出とリンパ球の増殖を検出できる、(2) TGN1412 の用量反応曲線はベルシェイプであり、有害事象が生じた臨床試験における血中濃度は、TGN1412 のリンパ球への作用の至適濃度領域であった、(3) カニクイザルのリンパ球では TGN1412 による細胞増殖やサイトカイン産生が起こらない、ことである。

C. 5. 1. 7. 1 TGN1412 の固定化

NIBSC の検討では、ヒト末梢血単核球 (Peripheral Blood Mononuclear Cells: PBMC) 懸濁液あるいは希釈したヒト全血に液相の状態では TGN1412 を添加してもサイトカイン放出が認められないものの、①ドライコーティングにより TGN-1412 をプレートに固定化、あるいは、②ドライコーティングにより抗 Fc 抗体を固定化したプレートに TGN-1412 を添加、または、③血管内皮細胞を播種したプレートに TGN-1412 を添加することにより、TGN-1412 を固定化した条件下では、ヒト PBMC の増殖およびサイトカイン放出が検出され、*in vivo* での反応性を反映した結果が得られている。TeGenero 社では、液相の状態では TGN1412 を添加してヒトリンパ球の反応性を調べる試験が行われていたため、その試験法では TGN1412 の生物活性を検出できていなかったことが指摘された。リンパ球活性化のために抗体を固定化して使用することが有効であることは、抗 CD3 抗体でも知られている^{68, 69)}。

ただし、治験薬概要書には soluble TGN1412 により T 細胞の増殖と活性化が起こると記載されており、両者の記載には相違がみ

られる。TGN1412 の生物活性については、実験施設間で一定した結果が得られ難く、評価が難しいものである可能性も考えられる。専門家グループの報告書には、ドライコーティングによりクロスリンクの効率がよくなることで反応が検出されやすくなることや、血管内皮細胞等に結合した TGN1412 のみが活性型として作用し、非結合型の TGN1412 が阻害的に働くことが高濃度の TGN1412 で効果が小さいことの理由であろうとする仮説が述べられており、NIBSC の検討結果は TGN1412 の性質を理解する上で無理がないものと思われる⁴⁸⁾。

C. 5. 1. 7. 2 TGN1412 の用量反応曲線

ヒトリンパ球の増殖と IL-2 産生に関する TGN1412 の用量依存性は、至適濃度が 2~10 $\mu\text{g/ml}$ (0.4~2 $\mu\text{g/well}$) で、用量反応曲線はベルシェイプとなっている。2 $\mu\text{g/ml}$ (0.4 $\mu\text{g/well}$) という濃度は、臨床試験での血中濃度に対応することから、実施された臨床試験では、TGN1412 の反応が最も起こりやすい用量が投与されたと考えられる。また、血管内皮細胞とリンパ球の共培養系では、TNF、IL-8 など炎症性サイトカインの放出が 0.1~10 $\mu\text{g/well}$ の濃度の TGN1412 で検出されており、TGN1412 の薬理作用であるリンパ球増殖や IL2 産生と、有害作用である炎症性サイトカインの放出が同じ濃度領域で生じている。つまり、TGN1412 の治療用量域と毒性用量域は重なっていると解釈できる。

C. 5. 1. 7. 3 カニクイザルとヒトの反応性の相違

カニクイザルのリンパ球では、ヒトリンパ球の反応性がみられる条件、すなわち TGN1412 を固定化した条件下においても、細胞増殖や

IL2 産生が検出されず、カニクイザルのリンパ球に対して TGN1412 はアゴニストとして働かないことが示された。つまり、カニクイザルは TGN1412 の安全性を評価する上で、適切な動物種ではなかったと言えよう。カニクイザルのリンパ球でも TGN1412 による IL2 受容体の発現増加がみられているため、カニクイザルにおいても CD28 への TGN1412 の結合と CD28 からの情報伝達系の活性化は起こっていると考えられる。Siglec などの抑制性分子の有無⁷⁰⁾がヒトとサルでの反応性の差の原因となっている可能性が考えられている。

以上のように、NIBSC で確立されたヒト細胞を用いた TGN1412 の *in vitro* 評価系では、TGN1412 の薬理作用のみならず有害作用も検出することが可能であった。臨床試験が実施される前にこのような試験が行われていれば、ヒトでの有害反応を予測できた可能性も考えられる。今後に向けた考え方として、TGN1412 と類似した作用機構を持つ抗体医薬品では、このような抗体のドライコーティングや血管内皮細胞との共培養系を用いてヒトリンパ球の反応を解析することにより、ヒトでの反応の予測に有用な知見が得られる可能性が考えられる。また、TGN1412 とは異なる作用機構を持つ医薬品においても、ヒト細胞／組織を用いた評価系は、ヒトにおける安全性を考える上で、極めて有用な情報を提供し得ると考えられる。

C. 5. 1. 8 抗 CD28 アゴニスト抗体を治療に用いることの妥当性：Abatacept との比較

生体における CD28 の役割は複雑である。CD28/B7 経路は、病原体に対する免疫応答や自己免疫疾患、移植片の拒絶などにおいて中心的な役割を果たす一方で、免疫応答の制御や末梢でのトレランスの維持にも関わっており、免

疫応答において逆の結果につながる補助シグナルと制御性シグナルの両方に関与していることが知られている⁷¹⁾。

TGN-1412 の適応疾患の一つは関節リウマチであったが、TGN1412 とは対照的に CD28 経路の阻害作用を持つタンパク質性医薬品 Abatacept が 2005 年に米国で関節リウマチを適応疾患として承認されている。Abatacept は CTLA4-Ig と呼ばれ、T 細胞表面に発現するタンパク質 CTLA4 (Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen) の細胞外ドメインと抗体の Fc 部分を融合させた人工タンパク質 (改変型タンパク質) である⁷²⁾。CTLA4 は活性化 T 細胞表面に発現し、CD28 より高い親和性でそのリガンドである B7 に結合することにより、B7/CD28 を介したシグナルをとめ、T 細胞の活性化を抑制する働きを持つ (Fig. 8)。CTLA4 と Fc の融合タンパク質である Abatacept は、CTLA4 と同様に B7 に結合することにより B7/CD28 を介したシグナルを阻害し、T 細胞の活性化を抑制する。これにより、抗原に対して T 細胞が不応答となるため、自己免疫疾患の治療に有効と考えられている。CD28 を介したシグナルを ON にするのが TGN1412、OFF にするのが Abatacept と考えると両者の働きは逆であるが、いずれも関節リウマチを適応疾患としている。

関節リウマチの治療のために、Abatacept によって CD28 のシグナルを阻害して T 細胞にアナジーを誘導して自己免疫反応を抑制することも、TGN1412 によって CD28 を活性化し制御性 T 細胞を誘導して自己免疫反応を抑制することも、理論的には可能であろう。しかし、健康な状態ではバランスが保たれている CD28 経路を、医薬品により活性化あるいは抑制の一方のみに調節する際には、どちらの方

向に調節をするべきであるか、疾患の状態に応じて、用量と投与時期を慎重に見極める必要がある。このように複雑な作用を持つ分子を標的とするには、病態の理解を深め、個々の患者がどの状態のあるかを見極める診断方法の開発も必要となると思われる。

C. 5. 2 TGN1412 事故が薬の開発（臨床・非臨床）に与えたインパクト

TGN1412 の臨床試験後、英国保健大臣から任命された専門家グループ（Expert Scientific Group）によって事故原因の検証が行われると共に、製薬企業団体や規制当局においても、非臨床試験から臨床試験への移行にあたって安全性面で特に注意が必要となるのはどのような医薬品か、また、そのようなリスク要因のある医薬品の開発過程では、安全性確保のためにどのような配慮をすべきであるかについて検討が行われ、その結果が Table 9 のような報告書やガイドラインとして公表された。その他にも、多くの意見が科学雑誌に掲載されている。すなわち、TGN1412 事故は、免疫系に作用するアゴニスト抗体のような特殊な医薬品では、これまでの方法では安全性確保が難しいことを明確にし、今後それらをどのように評価・開発していくかを議論する契機になったとも言える。

“Early stage clinical taskforce – Joint ABPI/BIA Report”は、英国製薬産業協会と英国バイオインダストリー協会のタスクフォースにより取りまとめられたものであり、ヒト初回臨床投与量を考える際の新たな指標として MABEL（Minimal Anticipated Biological Effect Level：最小予測生物学的影響量）が提唱されている⁷³⁾。TGN1412 臨床試験の検証にあたった専門家グループにより作成された

“Expert scientific group on phase one clinical trials – Final Report”では、事故原因の調査結果が報告されると共に、リスクの高い医薬品あるいは評価の難しい医薬品の臨床試験において、被験者の安全を確保するための推奨事項がまとめられている⁴⁸⁾。

規制側からの対応として欧州医薬品庁 European Medicines Agency (EMA) からは、TGN1412 の臨床試験で生じた深刻な有害事象を解析、議論した結果をふまえ、2007 年 3 月に、ハイリスク薬のヒト初回投与試験において考慮すべき要件を示したガイドライン案 “Guideline on requirements for first-in-man clinical trials for potential high-risk medicinal products” (DRAFT) が公表された⁷⁴⁾。このガイドライン案に対して、2ヶ月間パブリックコメントが募られ、さらに、2007 年 6 月にはワークショップが開催された。その後、2007 年 7 月に、“Guideline on strategies to identify and mitigate risks for first-in-human clinical trials with investigational medicinal products”として、治験薬のヒト初回投与試験で有害事象が生じるリスクの要因を明らかにし、リスクを低減するための方策を示したガイドラインが定められた (Table 10)⁷⁵⁾。

C. 5. 2. 1 EMA ガイドラインの概略

EMA のガイドライン “Guideline on strategies to identify and mitigate risks for first-in-human clinical trials with investigational medicinal products”では、化学薬品および生物薬品をガイドラインの適用対象として、ヒト初回投与試験で有害事象が生じるリスク要因に関する考え方が示されてい

る。そして、品質評価、非臨床試験の実施、初回臨床試験のデザイン等において、リスクを低減あるいはリスクに対処する方法が提示されている。

EMA のガイドラインの仮訳

GUIDELINE ON STRATEGIES TO IDENTIFY AND MITIGATE RISKS FOR FIRST-IN-HUMAN CLINICAL TRIALS WITH INVESTIGATIONAL MEDICINAL PRODUCTS

1. リスクの要因

治験薬のヒトへの初めての使用で生じる得る重篤な有害反応を予測するための方策の一つは、リスク要因を明らかにすることである。(1) 作用機構、(2) 標的の性質、あるいは、(3) 動物モデルの妥当性に関して、リスクが高いという知見がある場合、または、これらが不明確な場合には、リスクがあると懸念されるであろう。

開発者は、全てのヒト初回投与試験に関して、治験申請書の中で下記の判断基準について考察すること。これらの判断基準は、ケースバイケースで考慮されるべきである。

• 作用機構

新規な作用機構を持つことで必ずしもリスクが増すわけではないが、考えられる作用機構について、新規性と明らかになっている知見の程度について考慮すること。特異的な標的および標的外分子に対して生じる医薬品の作用の性質と強さ（影響の及ぶ範囲、増幅性、持続性、可逆性）、さらにそ

の下流の反応機構がこれに含まれる。実験により求められた用量反応曲線のタイプと傾き、すなわち、考えられる濃度の範囲で直線性が成り立つか、あるいは、非直線性か（最大効果でプラトーとなる、濃度変化以上に反応の変化が大きい、U型、ベル型）、といった特徴が重要である。

例えば、以下のような作用機構には、特に注意が必要であると考えられる。

—複数の情報伝達系に関連する分子を標的として含む作用機構（多様な効果を持つ標的）。

例えば、免疫系にしばしばみられるように、様々な生体反応につながる場合、標的が普遍的に発現している場合など

—生理的なフィードバック機構（例えば、免疫系、血液凝固系）による制御を越えて効果が増幅されるカスケード反応やサイトカイン放出。CD3 あるいは CD28 アゴニストがその例である。

作用機構に関連したリスク分析を行う際には、次のことも考慮に入れるべきであろう。

—関連する作用機構を持つものがヒトに投与された過去の例

—薬理作用を介した重篤な毒性発現のリスクに関する動物モデル（トランスジェニック動物、ノックインあるいはノックアウト動物などを含む）での実験結果

—有効成分の分子構造の新規性。例えば、受容体との相互作用を向上させた新規な改変体

● 標的の性質

ヒトにおける標的分子については、詳細に記載すること。作用機構以上に、標的分子の性質自体もヒト初回投与試験におけるリスク要因となり得るため、解析結果に基づき、下記について考察すること。

ーヒトにおける標的分子の構造、組織分布（ヒトの免疫系細胞での発現を含む）、細胞特異性、疾患特異性、機能制御、発現量、下流の反応系への影響を含む生物学的な機能、さらに、それらの個人差や患者と健常人での差に関する知見の程度。

ー可能であれば、適切な動物種あるいはヒトにおける標的分子の遺伝子多型、および、医薬品の薬理作用への遺伝子多型の影響。

● 動物種とモデルの妥当性

標的分子、標的分子の構造上のホモロジー、分布、情報伝達経路、薬理効果の性質を考慮して、利用可能な動物種とヒトとの比較を行うこと。

治験薬の薬理作用および毒性作用の評価を通じて、利用可能な動物種/モデルの妥当性が疑わしいと考えられた場合は、リスクが増すと考えること。

2. 品質

物理化学的性質および生物薬品の場合の生物学的性質の解析に関して求められる要件は、全ての治験薬に共通である。品質特性は、それ自体がヒト初回投与試験におけるリスクの原因とはなり得ないであろう。しかし、ヒト初回投与試験に先立つリスク評価においては、品質特性も考慮すべきで

ある。

考慮すべき要点は、以下の通り。

● 活性と力価の決定

安全な初回投与量を求めるためには、製品の活性や力価を測定する方法が、妥当であり、信頼でき、適格である必要がある。例えば、生物活性を基準として任意の単位で用量が表示され、測定系が適格でない場合や、測定系の信頼性が十分検証されていない場合は、非臨床試験で用いられた用量が正確でなく、安全な用量に関して誤った解釈がなされてしまう可能性がある。従って、生物活性の測定には、開発の早い段階から標準物質を整備することが重要である。生物薬品では、機能あるいは生物活性を測定するバイオアッセイがない場合は、その正当性を示すこと。

● 使用される製品の適格性

非臨床試験に用いられる製品は、ヒト初回投与試験で用いられる製品を体現したものでなければならない。開発の早い段階においても、適切な品質特性解析を行うことが重要である。製品の特性解析においては、不均一性、分解物プロファイル、および、工程由来不純物などの評価を行うこと。薬理活性あるいは毒性を持つ可能性のある不純物には特に注意すること。有効成分および製剤の特性解析を十分に行うために、試験法の妥当性と適格性に特に注意を払うこと。

非臨床試験からヒト初回投与試験に移行する際に、もし製品の品質に違いがあるならば、特に安全性に関して、臨床上、悪影響がないことを、十分に保証すること。さ

らに、開発の初期段階では、製造方法が変更されることがしばしばある。複雑な分子の場合は特に、製法変更により、おそらく特性解析では検出されないものの生物学的性質や臨床効果に影響し得るような微細な変化が有効成分に生じる可能性があるため、注意が必要である。

臨床に関する主要な決定は非臨床データに基づくため、非臨床試験のデータが引き続き有効であることを示すことが重要である。

次のような場合には、ヒト初回投与試験に用いる予定の製品について、追加の非臨床試験が必要となるであろう。

- 非臨床試験用と臨床試験用の製品に品質特性上の相違があり、その違いが臨床効果に悪影響を及ぼす可能性が考えられる場合。
- 製造方法が変更された場合で、生物学的性質の評価を含む製品の特性解析が限られていて、非臨床試験で用いられた製品が臨床試験で用いられる製品を体現していると保証できない場合。

● 超低用量の信頼性

指定された処方で、設定された用量どおりの量が投与されることを示すこと。非常に低い用量を調製するために製品を希釈して用いる場合、あるいは、製品が非常に低い用量で供給される場合には、器壁や点滴システムへの吸着のために用量の正確性が低下するリスクがある。その場合、初回臨床投与量の安全性と非臨床の安全性データを過大評価してしまう可能性がある。従って、適宜、最初に包装された製品と投与シ

ステム中の製品の互換性を調べるべきである。

3. 非臨床試験：動物モデルの妥当性の評価

ヒトと動物では、生物学的な反応において、質的および量的な違いが生じるであろう。例えば、標的分子との親和性、標的分子の組織分布、標的との結合に起因する細胞応答、細胞機能の調節機構、代謝経路、生理的バランスが崩れることに対する代償反応などにおける相違である。

ヒト由来細胞と試験に用いる動物種に由来する細胞を比較した *in vitro* 試験で作用に種特異性があることが示された場合は、ヒトの *in vivo* での反応を予測するという点で、その動物種を用いた *in vivo* 評価系の価値は下がるであろう。ただし、ヒト細胞と動物細胞で同様の反応が得られたとしても、*in vivo* で同等の結果が得られることが必ずしも保障されるわけではないことに注意が必要である。

現実的に、種特異性の高い医薬品の動物実験による評価では、以下のような可能性がある。

- ヒトで予想される薬理作用を検出することができない
- 薬物動態および薬力学の解析結果の誤った解釈につながる
- 毒性作用を見出すことができない

知見の重要性に基づいて方針を決定するプロセスでは、*in vivo*, *ex vivo*, *in vitro* のデータを統合して解釈すること。

種特異性の高い医薬品では、ヒトでのリスクを非臨床試験で評価することがより難しいが、種特異性が高いことで必ずしもヒ

ト初回投与試験におけるリスクが増すわけではない。

動物モデルの妥当性を示すためには、下記のような点についてヒトとの比較を行うことが考えられる。

— 標的分子の発現、分布、一次構造。ただし、標的分子のホモロジーが高いことは、必ずしも同等の効果が得られることを意味しない。

— 薬力学

・ 結合と占有率、必要に応じて細胞のシグナル伝達を含めた機能発現の結果

・ 他の機能ドメインがある場合には、動物におけるそのドメインの機能に関するデータ

(例:モノクローナル抗体のFc受容体システム)

— 代謝および他の薬物動態

— ヒトと動物の組織を用いた交差反応試験 (例:モノクローナル抗体)

適切な動物モデルを探索した過程は詳細に記載し、その妥当性を示すこと。

適切な動物種が存在しない場合は、その動物にとっての相同タンパク質の利用またはヒト型の標的分子を発現させたトランスジェニック動物の利用が唯一の選択であろう。医薬品と標的分子の相互作用によりヒトで予想されるものと同様の生体反応が得られる場合、データはより有用である。ヒト細胞を用いた *in vitro* 評価系の利用により、適切な追加情報が得られる。

用いられた全てのモデルの妥当性と限界については、注意深く考察し、添付する書類に全て記載すること。

4. 非臨床・臨床試験：ヒト初回投与量の設

定

初回投与量の設定はヒト初回投与試験の被験者の安全確保において、重要な要素である。用量設定には利用可能な全ての情報を考慮し、ケースバイケースの原則に基づいて行わなければならない。原理の異なるいくつかの方法が利用可能である。

一般には、最も感受性の高い適切な動物種を用いて実施された非臨床安全性試験により求められた最大無作用量 No Observed Adverse Effect Level (NOAEL) を、allometric factor または薬物動態学的解析に基づいて補正したものが、最も重要な情報となる。適切な投与量は、分子の特性や臨床試験のデザインに応じて、適切な safety factor を用いてさらに補正することにより算出される。

上記 1. に従いリスク要因があると考えられた治験薬では、用量設定のためにその他の方法を考慮するべきである。薬力学に関する解析が用量設定のための有用な情報となり得る。MABEL (Minimal Anticipated Biological Effect Level: 最小予測生物学的影響量) を用いる方法が推奨される。MABEL は、ヒトで最小限度の生物学的影響が得られると予測される用量である。この方法を用いる場合は、*in vitro* 試験などから明らかになるように、ヒトと動物の間で治験薬の作用機構に関して生じ得る感受性の違いを考慮する必要がある。下記のように MABEL からヒト初回投与量を算出する際には、safety factor を適用しうる。

MABEL の算出には、以下のような薬物動態/薬力学 (PK/PD) データから利用可能な全ての *in vitro* および *in vivo* の情報を利

用すること。

i) ヒトおよび適切な動物種由来の標的細胞における *in vitro* での標的分子との結合および占有率

ii) ヒトおよび適切な動物種由来の標的細胞における *in vitro* での用量反応曲線と、適切な動物種における *in vivo* での用量反応

iii) 適切な動物種への薬理量の投与可能な限り、MABEL 算出のために上記データを PK/PD モデルに統合して解析すること。

ヒトで有害反応が生じる可能性をさらに限定するため、MABEL からのヒト初回投与量算出には、**safety factor** が適用される場合もある。その際には、有効成分の新規性、生物活性、作用機構、種特異性の程度、用量反応曲線の形、MABEL 算出の不確かさなどのリスク要因を考慮する。用いた **safety factor** の妥当性を示すこと。

使用した方法（例：NOAEL、MABEL）により算出されたヒト初回投与量が異なる場合は、正当性が示されない限り、最も低い用量を用いること。

癌患者を対象に従来型の細胞毒性を持つ治験薬の試験を行うような特別な状況では、他の方法を取ることも考えられる。

C.5.2.2 EMEA ガイドラインの特徴

このガイドラインは、TGN1412 の事故を受けた今後の対策の一環として作成されている。TGN1412 事故の検証にあたった専門家グループからの報告書では、

- ・ 新規な作用機構を持つ生物薬品
- ・ 種特異性の高い新薬
- ・ 免疫系に直接作用する新薬

の3種類を、ヒト初回投与試験で有害反応のおこるリスクが高い、あるいは、非臨床試験でのリスク評価が難しい医薬品として挙げ、これらハイリスク薬の品質および非臨床・臨床試験に関する推奨事項が述べられていた。EMEA ガイドラインもドラフトの段階では、上記3種類に限定してはいないが、リスクの高い医薬品（化学薬品および生物薬品）を適用対象としていた。ドラフトをもとに、パブリックコメントやワークショップを含めた議論を経て策定されたガイドラインでは、全ての化学薬品および生物薬品を適用対象とし、リスク要因として考えるべきことを述べた形となっている。リスクの程度に関する判断基準は、個々の医薬品によって異なる、という意見が採用されたものと思われる。遺伝子治療薬と細胞治療薬はドラフトの段階から一貫して適用対象外となっている。

EMEA ガイドラインでは、ヒト初回投与試験で有害事象の発生が懸念されるのは、作用機構、標的の性質、あるいは、動物モデルの妥当性を考えたときに、リスクが高いという知見がある場合、または、それらが明確でない場合、の2通りであるとされた (Fig. 9)。このように、非臨床試験から臨床試験への移行に焦点を絞り、ヒト初回投与試験で有害事象が生じるリスク要因に関する考え方を明確に記載した点が EMEA ガイドラインの最も重要な特徴である。

TGN1412 の臨床試験で初回投与量の設定が適切でなかった可能性が高いことを受け、EMEA ガイドラインでは、リスク要因のある医薬品のヒト初回投与量の算出には MABEL を基準とした方法が推奨され、さらに、MABEL の算出のための方法が示された。これまで、マイクロドーズ試験のような特殊な場合を除き、臨床投与量は毒性を指標に NOAEL

を基準として考えられていたが、リスクの高い医薬品では、薬理作用を基準にヒト初回投与量を算出することを考えるべきであるということが明確に記載されている点も、本ガイドラインの特徴である。

ただし、ヒト初回投与量の設定に MABEL を基準とすることが推奨されるのは、ヒト初回投与試験で有害反応が生じるリスクが高いと考えられる場合であり、全ての治験薬について初回投与量を MABEL 以下とすることが求められているのではない。初回投与量を低く設定することは、臨床試験に必要な被験者数の増加と開発期間の延長につながることも考え、安全性を重視しつつ、個々の医薬品の特性に応じて、最も適切な初回投与量設定を考えるべきであろう。

適切な動物種がない場合の相同タンパク質やトランスジェニック動物の利用について、ICH S6 ガイドラインでは、“should be considered”とされているが、EMA ガイドラインのドラフトでは、“is strongly recommended”とされた。確定した EMA ガイドラインでは、“may be the only choice”と、やや表現が弱められている。相同タンパク質やトランスジェニック動物を用いた評価では、有用な情報が得られる場合があるものの、ヒトでの作用を完全に予測し得るものではない等の意見が採用されたものと思われる。TGN1412 の開発過程では、TGN1412 が作製される以前に、マウス抗ラット CD28 抗体 JJ316（サブクラスは IgG1）を用いて CD28 アゴニスト抗体の有効性や作用機構が検討されていた。JJ316 は TGN1412 の相同タンパク質であるとも考えることができるが、ラットでは問題となる有害反応が生じていなかったことを考えると、TGN1412 の安全性評価においては、相同

タンパク質は有用でなかったと言える。

EMA ガイドラインでは医薬品の品質に関する留意事項も具体的に記載されている。特に、バイオ医薬品では、医薬品の製造のために細胞を利用すること、有効成分が複雑な構造を持つことなどから、製品の品質が製造工程の影響を受けやすい。すなわち、生産用細胞株、培養条件、精製工程などにより、糖鎖などの修飾部分も含めた最終製品の構造、分解物、不純物プロフィールなどが変動する可能性があり、これらの変化が製品の薬理作用や毒性に影響することも考えられる。有効成分が糖タンパク質である場合は、得られる有効成分が複数の糖鎖構造を持つものの集団であり、構造上の不均一性を示すために、製造工程の変動により特に品質に差が生じやすい。抗体も糖タンパク質であり、糖鎖構造が生物活性に影響することが知られている。その一方で、バイオ医薬品の開発段階では、発現効率や精製効率の向上、混入汚染物質の不活化効率の向上、あるいは、コスト削減などのために、製造工程に変更が加えられることが少なくない。基礎研究から非臨床試験、臨床試験と移行するに従い、必要な製品の量も増えるため、スケールアップは必至である。

このような事情を背景に、EMA ガイドラインでは、非臨床試験で用いられた製品と臨床試験で用いる製品の品質特性に差がないことに注意すべきであること、製造工程に変更が加えられた場合や、製法変更の有無によらず品質特性に差が検出された場合に、臨床試験用の製品を用いた追加の非臨床試験が必要とされる場合があることが明記されている。開発の各段階で製品の品質の一定性を確保するためには、ガイドラインに示されているように、早い段階から適切な標準品を作成することが有効であると思われる。

0.0036mg/kg を投与した時の濃度に対応する。

C. 5. 2. 3 TGN1412 の MABEL 算出

MABEL (Minimal Anticipated Biological Effect Level) は、ヒトで最小限の生物学的影響が生じると予想される用量、すなわち、ヒトでの用量反応曲線の下限のところに対応する用量であり、ヒト初回投与量を MABEL 以下に設定することで、初回臨床試験における有害事象発生を極力避けることができると考えられる (Fig. 10)。以下に、専門家グループからの報告書を参考に、TGN1412 の MABEL について述べる。

C. 5. 2. 3. 1 標的占有率

MABEL の算出には、標的占有率が重要な指標の一つとなる。専門家グループからの報告書では、Fig. 11 に示したとおり、CD28 のターンオーバーがない、血液以外への抗体の分布や消失がない、投与後速やかに結合が平衡に達する、という前提のもと、0.1mg/kg の TGN1412 を投与されたヒトでは投与直後の CD28 の占有率が 90.6% になると算出されている。このように高い標的の占有率を示す状態では、薬理作用は最大限に生じていたものと考えられる。TGN1412 のようなアゴニスト活性を持つ医薬品では、初期の標的占有率が低いレベルにとどまるよう、用量を設定すべきであろう (Fig. 13)。標的占有率が 5~10% になる TGN1412 の用量は、0.001mg/kg 程度となる⁴⁸⁾。

C. 5. 2. 3. 2 ヒト細胞を用いた試験の結果

TGN1412 と同じ相補性決定領域を持つマウス抗ヒト CD28 抗体 5A.11 を用いた実験では、ヒト T 細胞の増殖が認められる最小濃度が 0.1 μg/ml であった⁷⁶⁾。これは、ヒトの血漿の総量を 2.5L、体重を 70kg とすると、約

C. 5. 2. 3. 3 動物を用いた試験の結果

マウス抗ラット CD28 抗体 JJ316 を用いた実験では、NOEL (No observed effect level) が <0.3mg/kg、薬理活性を示す至適濃度が 1~5mg/kg とされている。したがって、この試験系では、生物学的影響が認められる最小用量は、0.3~1mg/kg であると考えられる⁴⁸⁾。

これらの結果から、TGN1412 の MABEL は 0.001mg/kg 程度と考えられる。従って、ヒト初回投与量として許容される上限は、NOAEL

Fig. 11 のように標的占有率を求めるためには、標的分子の濃度が既知でなければならないが、標的分子が組織や、容量が一定でない滑液などに存在する場合は、それは容易ではない。そこで一般的に、抗体の標的分子の濃度が投与された抗体の濃度より十分低いと仮定できる場合は、以下の式により標的占有率を概算できるとされている (Fig. 12: 図中の解釈は本稿の著者によるもの)⁴⁸⁾。

$$Ro = 1 / (1 + Kd [nM] / (187 [nM/mg/kg] \times Dose [mg/kg]))$$

例えば、Kd[nM]の 200 分の 1 の値に対応する量[mg/kg]を投与された場合、初期の標的占有率は約 50%となる。

を基準に求められた 0.1mg/kg と比較して低い方の用量である 0.001mg/kg であったと考えられる (Fig. 14)。

TGN1412 のヒト初回投与量は、カニクイザルに投与された最高用量である 50mg/kg を NOAEL として算出されたが、IL-6 などのサイトカイン放出が薬理作用か有害作用かの見極め次第で、この判断の妥当性が異なってくる。

MABEL を指標とする場合は、検出された作用が薬理作用であるか有害作用であるかの区別は不要であるので、薬理作用と有害作用の区別が難しい場合は、MABEL を基準にすることで、適切な用量設定を行うことができると考えられる。

C. 5.3 TGN1412 事故が薬の開発（臨床・非臨床）に与えたインパクト：まとめ

TGN1412 の臨床試験は、リスクの高い医薬品の非臨床・臨床試験をどのように行うかを議論する契機となった。臨床における安全性確保のためには、ヒト初回投与試験で有害事象が生じるリスク要因の見極め、非臨床試験系の妥当性の検証、ヒト初回投与量の算出などに関して、個々の医薬品の開発段階での判断を適切に行うことが重要であると考えられる。TGN1412 の事故を受けて作成された EMEA のガイドラインは、非臨床試験から臨床試験への移行にあたって特段の注意を要するのはどのような医薬品か、また、ヒトで有害事象が発生するリスク要因があると考えられる医薬品の非臨床試験をどのように実施し、臨床試験をどのようにデザインするかを考える上で、今後の参考になるものと思われる。

本稿で考察した事項に関連して、TGN1412 事故を教訓に今後考えるべきこととして、以下のようなことが挙げられる。

(1) サイトカイン放出症候群に関して：

・リンパ球の活性化あるいはエフェクター細胞の活性化作用を持つ抗体医薬品では、常にサイトカイン放出症候群に対する十分な注意が必要である。

(2) 非臨床試験に関して：

・ヒトでの作用を予測し得るヒト細胞／組織を用いた試験系の開発を推進すべきである。

・ヒト由来細胞と動物由来細胞の反応性の比較を行うことは、非臨床試験系の妥当性を評価する上で有用であると思われる。

・目的外の作用も含めた医薬品の影響を評価するためには、トランスクリプトミクス、プロテオミクス、グライコミクスなどの Omics 解析も有用であると思われる。

・TGN1412 と類似した作用機構を持つ抗体医薬品では、抗体のドライコーティングや血管内皮細胞との共培養系を用いてヒトリンパ球の反応を解析することにより、ヒトでの反応の予測に有用な知見が得られる可能性が考えられる。

・ヒトの組織・細胞パネルを用いた抗体医薬品の交差反応性の検証は、安全性に関する重要な情報を与え得るため、非臨床試験の一つとして推奨されるものであると考えられる。

(3) 新しいコンセプトに基づく医薬品の開発に関して：

・CD28 のように複雑な作用を持つ分子を標的とするには、適切な用法用量の設定が必須であり、病態の理解を深め、個々の患者がどの状態のあるかを見極める診断方法の開発も必要となると思われる。

C. 5.4 今後の展望

TGN1412 は、T 細胞に発現する CD28 を標的とするモノクローナル抗体であり、免疫調節作用により、関節リウマチや B 細胞慢性白血病に用いることが考えられていた。その開発は前述のような結果に終わったが、抗体医薬品やその他のバイオ医薬品には、現在開発中のものも含めて、免疫制御を目的としたものが多い。これらの開発が進んだ結果、自己免疫疾患である関節リウマチのように、バイオ医薬品が治療に不可欠な存在となっている疾患もある。我が

国においても、関節リウマチの治療に、キメラ型抗 TNF α 抗体 Infliximab、あるいは、可溶性 TNF 受容体と Fc の融合タンパク質 Etanercept が使用できるようになり、既存の薬物療法では難しかった寛解を導くことも可能になったとされている⁷⁶⁾。その他に、ヒト抗 TNF α 抗体、抗 IL6 受容体抗体、抗 CD20 抗体、抗 RANKL 抗体などの抗体医薬品や、CTLA4 と Fc の融合タンパク質なども関節リウマチの治療に有効であることが期待されており、関連領域で有用なバイオ医薬品は今後も増えると予想される。

2007 年までに 22 品目のモノクローナル抗体が治療用医薬品として上市され (Table 11)、現在も多くの抗体医薬品の開発が精力的に進められている。その多くが免疫系に作用するものであるが、その他のバイオ医薬品にも、インターフェロン類、G-CSF や IL-2 などのサイトカイン類のように、免疫系に作用するものが多い。これらは、高い標的特異性を持ち疾病治療に有用である一方で、その使用に伴い、TGN1412 で生じたようなサイトカイン放出症候群のみならず、感染症や悪性腫瘍といった様々な有害事象が生じることも報告されている。免疫抑制作用を持つ医薬品では感染症が生じるリスクは避け得ないが、TNF α 阻害薬で報告されている B 型肝炎の再燃や結核のように、臨床で使用されて初めて明らかになる重篤なものもあることから、安全性評価には市販後調査なども含めた対策が必要と考えられる。また、免疫抑制作用を持つバイオ医薬品である Efalizumab (抗 CD11 抗体)、Infliximab (抗 TNF α 抗体)、Adalimumab (抗 TNF α 抗体)、Etanercept (TNF 受容体と Fc の融合タンパク質)、Alefacept (LFA3 と Fc の融合タンパク質)、Abatacept (CTLA4 と Fc の融合タンパ

ク質) では、いずれも悪性腫瘍の発生が報告されており、免疫抑制作用を持つバイオ医薬品では、悪性腫瘍の発生に常に注意が必要であろう。

現在、抗体医薬品の開発に多くの企業が注力している理由としては、これまでに抗体の医薬品としての価値が実証されてきたこと、また、抗体医薬品の開発の成功率が高いという近年の医薬品開発の実績があると思われる (米国において、第 1 相臨床試験が行われたもののうち上市されたものの割合は、低分子化合物では約 5%であるのに対して、抗体医薬品では約 20%であると報告されている)⁷⁸⁾。抗体作製の技術革新もこの動きを後押ししており、ファージディスプレイ法やヒト抗体遺伝子導入マウスを用いてヒト抗体を作成する技術が開発され、さらに、低分子化あるいはバイスペシフィック化した抗体など、改変型の抗体の開発も進められている。抗体以外にも、融合タンパク質や、アミノ酸配列改変型、修飾構造改変型などの各種の改変型タンパク質性医薬品、さらにタンパク質性医薬品以外に視野を広げれば、siRNA などの核酸医薬品、細胞組織利用医薬品、遺伝子治療薬の開発においても、実用化に向けた研究が進められており、構造の面でも作用の面でも新規性が高く、非臨床・臨床試験での評価が難しい医薬品は今後も増え続けると予想される。

臨床での安全性確保のため、新たな非臨床試験系の開発や、非臨床試験の妥当性検証を十分に行う努力が必要であることは言うまでもなく、本書で紹介されているような、毒性試験に追加されつつある新たな基礎技術などは、極めて有効な手段となるであろう。しかし、ヒトとモデル動物では生物学的にも生活環境の面でも違いがあることを考えると、非臨床試験で全てを明らかにすることは困難である。バイオ医薬品の安全性確保の上で最も重要な懸念事項