

- Altmann F, Stadlmann J, Stemmer C, Gorr G. In vivo glyco-engineered antibody with improved lytic potential produced by an innovative non-mammalian expression system. *Biotechnology journal*. 2(6), 700-8, 2007
- 37) Erbayraktar S, Grasso G, Sfacteria A, Xie QW, Coleman T, Kreilgaard M, Torup L, Sager T, Erbayraktar Z, Gokmen N, Yilmaz O, Ghezzi P, Villa P, Fratelli M, Casagrande S, Leist M, Helboe L, Gerwein J, Christensen S, Geist MA, Pedersen LO, Cerami-Hand C, Wuerth JP, Cerami A, Brines M. Asialo-erythropoietin is a nonerythropoietic cytokine with broad neuroprotective activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100(11), 6741-6, 2003
- 38) Elbers IJ, Stoop GM, Bakker H, Stevens LH, Bardor M, Molthoff JW, Jordi WJ, Bosch D, Lommen A. Influence of growth conditions and developmental stage on N-glycan heterogeneity of transgenic immunoglobulin G and endogenous proteins in tobacco leaves. *Plant physiology*. 126(3), 1314-22, 2001
- 39) Gomord V, Chamberlain P, Jefferis R, Faye L. Biopharmaceutical production in plants: problems, solutions and opportunities. *Trends in biotechnology*. 23(11), 559-65, 2005
- 40) Bakker H, Schijlen E, de Vries T, Schiphorst WE, Jordi W, Lommen A, Bosch D, van Die I. Plant members of the alpha1->3/4-fucosyltransferase gene family encode an alpha1->4-fucosyltransferase, potentially involved in Lewis(a) biosynthesis, and two core alpha1->3-fucosyltransferases. *FEBS letters*. 507(3), 307-12, 2001
- 41) Palacpac NQ, Yoshida S, Sakai H, Kimura Y, Fujiyama K, Yoshida T, Seki T. Stable expression of human beta1,4-galactosyltransferase in plant cells modifies N-linked glycosylation patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96(8), 4692-7, 1999
- 42) Gomord V, Sourrouille C, Fitchette AC, Bardor M, Pagny S, Lerouge P, Faye L. Production and glycosylation of plant-made pharmaceuticals: the antibodies as a challenge. *Plant biotechnology journal*. 2(2), 83-100, 2004
- F. 健康危険情報  
該当事項なし
- G. 研究発表
1. 論文発表、総説
- 1) Nana Mukai, Taichi Akahori, Motohiro Komaki, Qin Li, Toshie-Kanayasu-Toyoda, Akiko Ishii-Watabe, Akiko Kobayashi, Teruhide Yamaguchi, Mayumi Abe, Teruo Amagasa, Ikuo Morita: A comparison of the tube forming potentials of early and late endothelial progenitor cells. *Exp Cell Res*. 314, 430-440 (2008)
- 2) Toshie Kanayasu-Toyoda, Akiko Ishii-Watabe, Takayoshi Suzuki, Tadashi Oshizawa, and Teruhide Yamaguchi: A new role of thrombopoietin

- enhancing ex vivo expansion of endothelial precursor cells derived from AC133 positive cells. J. Biol. Chem. 282, 33507-14 (2007)
- 3) Kawai H, Suzuki T, Kobayashi T, Ishii-Watabe A, Sakurai H, Ohata H, Honda K, Momose K, Hayakawa T, Kawanishi T. Caspase Cascade Proceeds Rapidly After Cytochrome c Release From Mitochondria in Tumor Necrosis Factor-alpha-Induced Cell Death. J Pharmacol Sci. 103(2), 159-67 (2007)
  - 4) 山口照英、石井明子 細胞・組織加工医薬品の品質と安全性確保への提言 PHARMSTAGE (印刷中)
  - 5) 山口照英、石井明子 次世代バイオ医薬品の開発にあたっての非臨床・臨床試験について -TGN1412 が薬の開発に与えたインパクト- 毒性質問箱 第 10 号 p.1-p.33 サイエнтиスト社、2007
  - 6) 石井明子、鈴木琢雄、川西 徹、山口照英、早川堯夫 バイオ医薬品の開発と品質・安全性確保 P.702-718 植物を用いた医薬品の現状と品質・安全性の確保 エル・アイ・シー、2007
  - 7) 堤康夫、石井明子、早川堯夫 バイオ医薬品の開発と品質・安全性確保 p.369-378 機能性人工タンパク質 エル・アイ・シー、2007
  - 8) 内田恵理子、石井明子、山口照英 遺伝子治療薬及び細胞治療薬のウイルス安全性確保 臨床とウイルス 35, 278-290, 2007
2. 学会発表
    - 1) 豊田淑江、石井明子、山口照英：トロンボポエチンの血管内皮前駆細胞増幅作用における新しい役割 第7回 日本再生医療学会総会 2008年3月
    - 2) 鈴木浩子、石井明子、豊田淑江、田村悦臣、山口照英：ヒト臍帯血単核球由来 Outgrowth Endothelial Cell の誘導法確立と特性解析 日本薬学会 第128年会 2008年3月
    - 3) 豊田淑江、石井明子、鈴木孝昌、押澤正、山口照英：トロンボポエチンによる、in vitro での血管内皮前駆細胞の増幅作用 第80回日本生化学会大会 2007年12月
    - 4) 石井明子、豊田淑江、鈴木琢雄、小林 哲、山口照英：細胞組織利用医薬品としての血管内皮前駆細胞の誘導法確立と特性解析 第51回日本薬学会関東支部大会 2007年10月
    - 5) 鈴木琢雄、櫻井教美、石井明子、小林 哲、大幡久之、本田一男、川西 徹、山口照英：カスパーゼ 3,9(8)活性化の単一細胞内同時測定による小胞体ストレスと TNF- $\alpha$  誘導アポトーシスの比較 バイオイメーキング学会 2007年10月
    - 6) 豊田淑江、石井明子、鈴木孝昌、押澤正、山口照英：トロンボポエチンによる in vitro での血管内皮前駆細胞の増幅作用 第28回日本炎症・再生医学会 2007年8月
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得 なし
  2. 実用新案登録 なし
  3. その他 なし

**Table 4**

EMEA および FDA より公表されている Tg 植物関連ガイドライン案中の翻訳後修飾関連の記載

**EMEA ガイドライン案**

**Guideline on the Quality of Biological Active Substances Produced by Stable Transgene Expression in Higher Plants (2006年7月)**

<p>緒言</p>	<p>原核生物、酵母、あるいは、動物細胞を用いた永年の実績を有する組換えタンパク質の生産システムを補完し得るものとして、トランスジェニック植物を用いた方法が台頭してきている。しかし、トランスジェニック植物に特有な事項について考慮していかなければならない。例えば、植物では糖鎖修飾等の翻訳後修飾が他の真核生物とは異なるため、生産物の品質特性に差が生じる可能性があり、生産された有効成分の免疫原性等の安全性・有効性プロファイルに影響が生じることも考えられる。例として、植物の N 結合型糖鎖には末端のシアル酸がなく、ハイマンノース型糖鎖にはリン酸が付加されない。また、植物の複合型糖鎖には、ヒトにはない結合様式を持つフコースやキシロースを含むものが多い。</p>
<p>4.1 遺伝子組換え体の作製 4.1.1 宿主植物</p>	<p>選択した植物については、分類学に関する参考文献を引用して、科、属、種、亜種、栽培品種、一般名を記載する。植物の糖鎖修飾パターン、成長特性、耐性などのような宿主植物の特性も改変されることがあるが、そのような場合は、改変された宿主植物の樹立についても詳細に記載し、用いられた方法も説明すること。</p>
<p>4.3 有効成分の品質管理 4.3.1 特性解析</p>	<p>植物の糖鎖付加に関しては、定性的および定量的な包括的な特性解析を行う必要がある。これには、単糖組成の決定、タンパク質から切り出される糖鎖の分析（例：分岐構造の決定、マッピング）、タンパク質への糖鎖の結合（例：部位ごとの糖鎖付加、グリコフォームの分布）を含むこと。特性解析では、糖鎖以外の翻訳後修飾（例：アセチル化、リン酸化、レクチン、脂質、ポリフェノールの付加）の分析も行うこと。天然のヒトタンパク質に存在することが知られていない残基や結合様式には特に注意を払う必要がある。ヒトタンパク質にない修飾が存在する場合は、その点に特に注目し、それらをモニターする手法あるいは除去する手法を詳細に記載すること。</p>

FDA ガイダンス案

Guidance for Industry: Drugs, Biologics, and Medical Devices Derived from Bioengineered Plants for Use in Humans and Animals (2002年9月)

<p>V ヒトに用いられる医薬品生産用組換え植物由来製品の<sup>1</sup>前臨床段階での留意事項</p>	<p>C. アレルゲン性</p> <p>製造に用いる原材料植物がアレルゲン性あるいは免疫原性をもつ場合、製品中のそれらの物質について試験を行うこと。糖鎖（例：キシロース）のような植物特異的な修飾が製品の免疫原性あるいはアレルゲン性に影響する可能性について考慮すること。</p> <p>最終製品について、N型糖鎖のようなアレルゲン性を決定するものを評価すること。原材料に対してアレルギーを持つ患者の血清を用いて特異的血清による発現タンパク質のスクリーニングができる。特異的血清を用いて陽性の結果が得られた場合は、製品がアレルゲン性を持つことが示唆される。</p>
	<p>D. <u>免疫原性</u></p> <p>意図しない免疫原性の原因となる植物特異的な修飾について評価すること。製品の免疫原性に関する標準的な試験を、既存のガイダンス（ICHガイドライン S5B, S6）およびFDAとの協議にしたがって実施すること。</p>

承認年	1985	1990	1995	2000	2005
大薬種	インスリン インターフェオンアルファ2a インターフェオンアルファ2b ソマトロピン インターフェオンガンマ1a	フィルグラスチム ナルトグラスチム マゲセルミン セルロトキシン テロトキシン インターフェオンガンマ1a	ナルトグラスチム マゲセルミン カルベリゼン グルカゴン		インターフェオンベータ1b インスリンリスポ インターフェオンアルファエノ1 トラフェルミン インスリングルルギン
薬名	B型肝炎ワクチン インスリン			インスリンアスパルト	インスリンデテミル 人血アルブミン
動物種別		エボエチンアルファ エボエチンベータ アルテプラゼ レノグラスチム ソマトロピン オクトコグアルファ ルリオクトコグアルファ		パミテプラゼ モノテプラゼ イグルセラゼ エプタコグアルファ ルリオクトコグアルファ リクキシマブ トラスツスマブ パリヒスマブ インフリキシマブ バシリキシマブ	タルベエチンアルファ アガルスダーゼベータ ラロニダーゼ アルグルコシダーゼアルファ フォトリピンベータ ホトリピンアルファ インターフェオンベータ1a トシリスマブ ゲムツスマブオノマイジン エタネルセプト ヘパシスマブ イブリクモマブチウキセタン トロンボモジュリンアルファ
ヒト種別			B型肝炎ワクチン		アガルスダーゼアルファ イデュルスルファゼ

Fig.1 我が国における組換えタンパク質医薬品の生産宿主別承認年

Table1 トランスジェニック植物での発現が報告されているタンパク質の例

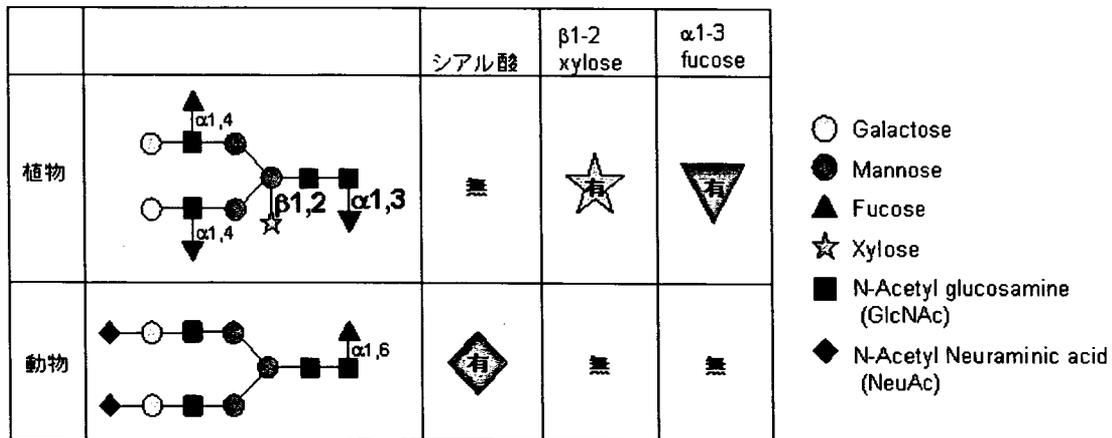
分類	酵素関連	ホルモン・サイトカイン	血液関連	抗体関連	その他
実例	アデノシンデアミナーゼ グルタミン酸デカルボキシラーゼ グルコセレブロシダーゼ リゾチーム 胃リパーゼ 膵リパーゼ 分泌型アルカリホスファターゼ アプロチニン	GH EGF IGF-1 EPO IL-2 IL-4 IL-10 IL-12 IL-18 IFN $\alpha$	血清アルブミン 第Ⅳ因子 (A $\beta$ メイン) プロテインC ヘモグロビン	IgG IgM sIgA/G Fab scFv Diabody	内因子 ラクトフェリン コラーゲン

Table 2 組換え植物を用いて生産されたタンパク質医薬品の臨床試験

組換えタンパク質	適応症	生産方法	収穫後	臨床試験	投与方法	備考
抗 <i>S.mutans</i> 抗体 (分泌型IgA/G:CaroRx)	虫歯	組換えタバコ	精製	Phase II	口腔内	糖タンパク質
胃リパーゼ (Merispace)	嚥酸性蝕歯症、肺炎	組換えトウモロコシ	精製	Phase II	経口	糖タンパク質
ヒト内因子	ビタミンB <sub>12</sub> 欠損症	組換えシロイタナズナ	精製	Phase II	経口	糖タンパク質
インターフェロンα (徐放性製剤Locteron)	O型型肝炎	組換えウキクサ	精製	Phase II	皮下*	対照薬:ベグイントロン
インターフェロンα (BLX-633)	Locteronの有効成分	組換えウキクサ	精製	Phase I	筋肉内*	対照薬:イントロン
ラクトフェリン	ドライアイ	組換えトウモロコシ	精製	Phase I	点眼	糖タンパク質
大腸菌 易熱性腸管毒素B6型 ワクチン	下痢	組換えトウモロコシ	未精製	Phase I	経口	
大腸菌 易熱性腸管毒素B6型 ワクチン	下痢	組換えジャガイモ	未精製	Phase I	経口	
HBV表面抗原 ワクチン	B型肝炎	組換えジャガイモ	未精製	Phase I	経口	
HBV表面抗原 ワクチン	B型肝炎	組換えレタス	未精製	Phase I	経口	
ノーウォークウイルススプアジド ワクチン	ノーウォークウイルス感染	組換えジャガイモ	未精製	Phase I	経口	
scFv (ワクチン)	非ホジキンリンパ腫	タバコ(←過性発現)	精製	Phase I	皮下	
狂犬病ウイルス ワクチン	狂犬病	ホウレンソウ(←過性発現)	未精製	Phase I	経口	

EMBO Rep. 6, 593, 2005  
Expert Opin. Emerg Drugs 10, 185, 2005  
をもとに作成

\*投与方法が明らかでないため、対照薬の投与方法を記載した。



Gomord V et al. Plant Biotech J 2, 83, 2004  
Hueter CM et al. Plant Biol 7, 292, 2005 を元に作成

表記方法は、Symbol and Text Nomenclature for Representation of Glycan Structure  
Nomenclature Committee Consortium for Functional Glycomics  
(<http://glycomics.scripps.edu/CFGnomenclature.pdf>) を参考にした。

Fig. 2 植物由来N結合複合型糖鎖の特徴

Table 3 タンパク質性医薬品に対する抗体産生の頻度

	製品	抗体出現率
ホルモン	hGH	<1-75%
	Follitropin	-
	Insulin	variable
血液凝固因子	Factor IX	1.8-3.6%
	Factor VIII	~30%
酵素類	Glucocerebrosidase	13%
	$\alpha$ -galactosidase	88%
線溶系因子	tissue plasminogen activator	<1%
サイトカイン類	PEG-MGDF(*)	0.6-4%
	Thrombopoietin	<10%
	Erythropoietin(*)	rare
	Bone Morphogenic Protein-7	13-38%
	Interferon $\alpha$ 2a	30-50%
	Interferon $\alpha$ 2b	0.8-7%
	Interferon $\beta$	10-45%
	Interferon $\gamma$	-
	IL-2	47-74%
	GM-CSF	4-55%
	IL-11	<1%
G-CSF	-	

Koren E. et al. *Curr. Pharm. Biotech.* 3, 349, 2002 を元に作成

(\*)産生された抗体が内因性タンパク質の活性を中和することにより重篤な臨床症状が生じたことが報告されている。

製品関連の因子

タンパク質の構造  
 目的物質由来不純物  
 e.g., 凝集体  
 分解物  
 製造工程由来不純物  
 e.g., 宿主細胞由来タンパク質  
 滲出物  
 添加剤  
 剤形  
 保存方法  
 投与経路  
 タンパク質の免疫制御能

患者関連の因子

遺伝的要素  
 e.g., 遺伝子欠損  
 HLAタイプ  
 年齢  
 疾患関連因子  
 併用療法  
 同様のタンパク質の使用履歴  
 内因性タンパク質の濃度  
 投与頻度と投与量  
 治療期間

Fig.3 タンパク質性医薬品の免疫原性に影響を与える因子

分担研究報告書

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－

分担研究者 山口照英 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

作用の種特異性が高く、動物モデルでの評価が困難なバイオ医薬品では、非臨床試験の結果をもとに臨床適用における有効性・安全性について十分な評価を行うことが困難な場合も多い。ヒト CD28 に対するアゴニスト抗体 TGN1412 の臨床試験での重篤な有害事象発症に関して、様々な議論が行われている。本研究では、TGN1412 を含め、リスクの高いバイオ医薬品の開発における要件やヒト投与に当たって求められる対応について検討を行った。その結果、TGN1412 に関しては様々な要因が重篤な有害事象を引き起こしたと想定されている。また、非臨床試験結果に基づいて行われた用量設定が適切でなかった可能性が指摘されている。特に、TGN1412 が血管内皮細胞と結合して非常に強い薬理作用が出たことも要因の一つとしてあげられる。ただ、従来の製品でもいわゆるサイトカインストームや infusion 反応も起こっている。従って、こういったリスクのあるバイオ医薬品、特にアゴニスト作用のあるバイオ医薬品の安全性評価では、開発段階での生物活性の評価やヒトへの投与に当たって慎重な対応が必要とされる。一方で、このような慎重な投与が全ての製剤で必須と言うわけではない。すなわち、従来のバイオ医薬品に無いような新規の薬理作用を持つ製品、特にアゴニスト作用を持つ抗体等の開発では、より慎重な特性解析、基礎及び非臨床試験での生理作用の解明、ヒトでの初期投与量設定の新たな基準の採用などが必要となってくるであろう。

研究協力者

国立医薬品食品衛生研究所・生物薬品部長  
石井明子

A. 目的

抗体医薬品は、標的分子と特異的に、高い親和性をもって結合する。このことが薬効を発揮する上では重要であるが、ヒトタンパク質を標的とする抗体医薬品の場合、非臨床試験で用いられる動物に存在する相同分子との構造上の違い等から標的分子との結合が弱い、あるいは検出されない場合があり、安全性を評価するた

めの非臨床試験系の有用性がしばしば問題となる。標的分子に対する高い特異性は、タンパク質性医薬品（バイオ医薬品：脚注 1）に共通した特徴であるが、インスリンや成長ホルモンのように補充療法に用いられる古典的なバイオ医薬品は、生体内タンパク質と同一あるいは同等の構造をもつタンパク質として製造されたものであるため、その有効性・安全性のプロファイルは天然のタンパク質の特性をもとに、ほぼ明らかであると考えることができた。しかし、近年開発がさかんなキメラ型抗体、ヒト化抗体、各種の融合タンパク質や改変タンパク質

などの天然に存在しない構造を持つタンパク質性医薬品では、有効性・安全性プロファイルが未知であるため、非臨床試験さらには臨床試験でそれを明らかにしていくことが求められる。

バイオ医薬品の非臨床試験における安全性評価では、目的タンパク質の構造の多様性や不均一性、作用発現の動物種特異性、免疫原性など、バイオ医薬品の物性面や作用面での特徴・特殊性からみて、従来の医薬品（特に化学合成医薬品）において実施される定型的な非臨床安全性試験の種類・項目および試験方法をそのまま機械的に適用することは妥当ではなく、従来とは異なる観点や方法で試験を実施すべき場合が多い<sup>1)</sup>。バイオ医薬品の非臨床試験をどのように行い、ヒトへの投与にあたって安全性を担保していくかについては、これまでも議論が重ねられ、一般原則を記載した国際調和ガイドラインも作成されている<sup>2)</sup>。しかし、TGN-1412 での有害事象では、作用の種特異性が高いアゴニスト抗体医薬品の評価の難しさを示すことになった。

一般に、化学薬品では、濃度によっては標的分子以外へ作用を示すものも多いことから、有害反応の主な原因が off-target 効果であることが少なくないのに対して、抗体医薬品などのバイオ医薬品では、標的分子との結合特異性が非常に高いため、有害反応の主な原因は on-target 効果であるとされている<sup>3)</sup>。すなわち、バイオ医薬品の安全性を考える際には、その生物学的性質や薬理作用に関する十分な理解が必須である<sup>3)</sup>。TGN1412 の例においても、有害反応の原因は TGN1412 の生物学的な作用にあるとされ、標的分子を介した反応がサイトカイン放出症候群につながったと考えられている<sup>4)</sup>。しかし、重篤な例は稀であるが、サイトカイン放出症候群はこれまでに他の抗体医薬品でも生じている<sup>5,6)</sup>。

そこで本研究では、TGN1412 の開発にあたって、過去の知見に基づいてサイトカイン放出症候群の危険はどのように考えられていたのか。また、他の抗体医薬品で報告されているサイトカイン放出症候群とはどのような違いがあったのかを明らかにし、このような作用の種特異性が高く、アゴニスト作用を持つバイオ医薬品を開発していく際に求められる基礎的検討や、開発初期や非臨床試験で明らかにすべき生理作用等について明らかにすることを試みた。

## B. 方法

TGN1412 の臨床試験に関しては既に多くの専門家から解説がなされているが、本稿では、バイオ医薬品の特性と品質・安全性確保に関心を寄せている立場から、TGN-1412 の特性と他の抗体医薬品との比較に基づき、改めて TGN1412 の事故を振り返ると共に、TGN1412 による有害事象発生の原因検証とその後の議論をもとに欧州医薬品庁から公表された“ヒト初回投与試験におけるリスク要因の同定およびリスク低減のための方策に関するガイドライン”を紹介し、この事故を教訓にした今後の非臨床・臨床試験のあり方を考察する。

## C. 結果及び考察

### 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 1.1~1.6 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 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、Fcγ 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。

### 1.1 TGN1412 の特性

TGN1412 は、ヒト化抗ヒト CD28 抗体(脚

注 2) で、T 細胞表面分子 CD28 に結合する。サブクラスは IgG4 (脚注 3)。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 (図 1,2) <sup>7)</sup>。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とされている <sup>8,9)</sup>。

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 <sup>10)</sup>。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。

### 1.2 TGN1412 の臨床試験

健康人を対象とした 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、methylpredonisolone、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<sup>11)</sup>。

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 $\alpha$  の急激な増加と、それに続く IL-2、IL-6、IL-10、IFN $\gamma$  等の増加が認められている (図 3)<sup>4)</sup>。サイトカイン放出は、hydrocortisone や methylpredonisolone 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<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 細胞は、投与 24 時間後まで測定限界以下となっている<sup>11)</sup>。

### 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 (脚注 4) (表 1)。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<sup>4)</sup>。

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<sup>12, 13)</sup>。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<sup>10)</sup>。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 (表 2)、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<sup>12)</sup>。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<sup>10)</sup>。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<sup>10)</sup>。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<sup>14)</sup>、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。

### 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<sup>5, 6)</sup> (脚注 5)。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<sup>5,6)</sup>。

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 Fc $\gamma$  受容体との結合を介した T 細胞の活性化

◆Fc $\gamma$  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<sup>15-18)</sup>。

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<sup>17)</sup>。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 $\gamma$  受容体とも結合する。Fc $\gamma$  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 $\gamma$  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<sup>19)</sup>。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<sup>19)</sup>。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<sup>19)</sup>。

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、methylprednisolone の前投与を受けなかった患者で、TNF $\alpha$  の上昇がより顕著となる傾向がある<sup>20)</sup>。

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 $\gamma$  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<sup>21,22)</sup>。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。脚注 5 に記載したように、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%<sup>23)</sup>、Alemtuzumab では 83%<sup>24)</sup> 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。

### 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 $\gamma$  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 $\alpha$  と IFN $\gamma$  を含めた炎症性サイトカイン

ンの放出が起ったことが報告されている<sup>25)</sup>の  
に対して、TGN1412を投与されたカニクイザ  
ルではTNF $\alpha$ およびIFN $\gamma$ 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<sup>10)</sup>。

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 $\gamma$ 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')<sub>2</sub>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')<sub>2</sub>ではT細胞  
の増殖が起こらなかったと記載されている(図  
4)<sup>26)</sup>。

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(図  
5)。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Alemutuzumab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  
 $\alpha$ 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<sup>27)</sup>。

蛇足ながら、Muromonab-CD3、Rituximab、  
あるいはAlemutuzumab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、  
Alemutuzumab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 $\gamma$ 受容体との結合を介した  
T細胞の活性化やFc $\gamma$ 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 $\gamma$ 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<sup>18)</sup>。一方、Rituximabや  
Alemutuzumab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。

## 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<sup>11)</sup>。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<sup>11)</sup>。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<sup>11)</sup>。TNF $\alpha$ 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<sup>+</sup>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<sup>+</sup>T細胞、CD8<sup>+</sup>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<sup>11)</sup>。

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 $\alpha$ 濃度の上昇、続くIFN $\gamma$ 、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<sup>11)</sup>。

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。

## 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<sup>4)</sup>、最近、最終結果が論文としても

報告された<sup>28)</sup>。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。

#### (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<sup>29, 30)</sup>。

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おこ

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原因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<sup>4)</sup>。

#### (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 2~10µg/ml (0.4~2ug/well) で、用量反応曲線はベルシェイプとなっている。2µg/ml (0.4µg/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 0.1~10µg/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。

#### (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<sup>31)</sup>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。

### 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<sup>32)</sup>。

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<sup>33)</sup>。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 (図 6)。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向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。

## 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、その結果が表 3 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<sup>3)</sup>。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<sup>4)</sup>。

規制側からの対応として欧州医薬品庁 European Medicines Agency (EMA) から、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<sup>34)</sup>。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 (表 4)<sup>35)</sup>。

### 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。

— 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。

—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