

4. 細胞基材由来タンパク質性医薬品における目的物質及び有効成分

2項や3項での問題への直接的な対応として、細胞基材由来タンパク質性医薬品における「目的物質」や「有効成分」とは、物質面からみてどのようなものであり、「目的物質」や「有効成分」といえないものはどのようなものであるかを明確に定義しておくことがまず何よりも重要である。これは、組換え医薬品や細胞培養医薬品の本質やアイデンティティについて論じ、一般名称を定め、構造解析や特性解析、品質評価をする上での基本中の基本となる。ICHの特性解析・規格に関する国際調和ガイドラインを作成する際にも「目的物質」をどのように定義するかは、最もホットな議論の対象の1つであった。議論の収束に基本的な方向付けをしたのは、わが国から出されたコンセプトであった。このコンセプトは、前項で述べたタンパク質性医薬品生産の特徴であり、生産物に不可避免的に存在する分子の不均一性の問題に対してどのように対処すればよいか、また、タンパク質性医薬品における分子構造的な識別結果と生物活性との多様な関係を踏まえつつ、これらの医薬品における「有効成分」、「目的物質関連物質」、「目的物質由来不純物」の定義や各物質の相互の関連付けも含めて論点を整理し、向かうべき方向を明確にするべく提起されたものであった。

ICHガイドラインでは、「目的物質」は、表1のように定義されている。

すなわち、

- 1) 予期した構造を有するタンパク質
 - 2) DNA塩基配列から期待されるタンパク質
 - 3) しかるべき翻訳後修飾(グリコフォームを含む)から期待されるタンパク質
 - 4) 生物活性分子を生産するのに必要な、意図的な加工・修飾操作から期待されるタンパク質
- のいずれかにあてはまるものを指すと定義された。

表1 ICH組換え医薬品等における「目的物質」の定義

以下のいずれかにあてはまるタンパク質を指す。

- 1) 予期した構造を有するタンパク質
(例:モノクローナル抗体)
- 2) DNA塩基配列から期待されるタンパク質
(例:単純タンパク質)
- 3) しかるべき翻訳後修飾(グリコフォームを含む)から期待されるタンパク質
- 4) 生物活性分子を生産するのに必要な、意図的な加工・修飾操作から期待されるタンパク質
(例:不活性前駆体→目的活性タンパク質)

このうち、1)はモノクローナル抗体のような場合を想定している。モノクローナル抗体は、抗体に共通する構造とあるエピトープに対して特異的に反応できる構造を持つタンパク質ということがその最大の特徴なので、そういう予期した構造を有するタンパク質という特徴的なカテゴリーに属するものとして取り扱うことが合理的であろうと考えられた。これにはタンパク質として分子量が大きく、全構造の決定は容易でない場合もあることなどの背景も考慮されている。糖鎖の多様性も含めて考えると完全な分子構造決定はできない。2)はインスリンや成長ホルモンのような単純タンパク質のようにDNA塩基配列から直接、最終産物の分子構造(一次構造)が予測・期待されるタンパク質を想定している。3)は、前項で述べた生産物に不可避免的に存在する分子の不均一性の問題への対処を考慮したもので、得られた不均一な分子集合体を総体として目的物質として取り扱うことが合理的であるとの考えに基づいて定義されたものである。4)は、まず前駆体をバイオ技術で生産し、その後、製造工程のある段階で意図的に加工修飾して生物活性分子を生産する場合、そこから期待されるタンパク質等を想定している。一部の機能性人工タンパク質等もこのカテゴリーに相当するかもしれない。タンパク質性医薬品の場合、化学薬品のように、ある化学構造がきちんと書け、これが単一目的物質ということは多くの場合期待で

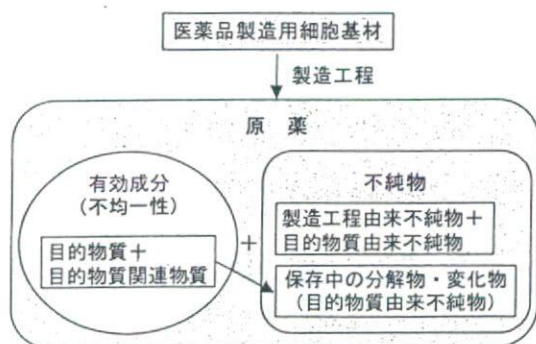


図1 組換え医薬品等における「有効成分」、「目的物質」、「目的物質関連物質」、「目的物質由来不純物」の相互の関連付け

きない。また、種類ごとにそれぞれ現実的に得られるものと期待されるものが異なり、また分子として相互に識別し、あるいは解析できることに限界がある。こうした事情を背景に、desirableなproductは何かということ、ICH文書中では“Desired Product”という用語が用いられ、「目的物質」に様々なカテゴリーがあるという整理になっている。

一方、明らかに翻訳後修飾以降に起こった変化によって生じたとみなされる変化体は、当然、目的物質の範疇には含めない。しかし、これら製造中あるいは保存中に生成する目的物質由来の物質は、その特性に応じてさらに2つのカテゴリーに分類して取り扱うことが合理的であるとされた。まず、目的物質から派生した物質のうち、活性があり、製品の安全性及び有効性に関して悪影響を及ぼさないもの、すなわち、目的物質に匹敵する特性を備えているものは「目的物質関連物質」と称し、不純物とは考えず、「有効成分」として扱うこととされた。生物活性の面から考えると「目的物質」と「目的物質関連物質」を合わせたものを「有効成分」とすることが实际的であり合理性もあるということである。ただし、「目的物質関連物質」には当然、許容量に限界が設けられる必要がある。他方、目的物質の分子変化体(例えば、

前駆体、製造中や保存時に生成するある種の分解物・変化物など)で、生物活性、有効性及び安全性の点で目的物質のそれに匹敵する性質を持たないものは「目的物質由来不純物」と称し、文字通り不純物として扱うこととなった。これらの関係付けを図1に示した。

5. 目的物質等の組成分析、構造及び特性解析

目的物質について当初のシナリオどおり意図した化学構造を有する物質が得られたかどうかを適切な組成分析、構造解析法を駆使して確認、同定する必要がある。糖タンパク質については、糖鎖の種類、構造及び付加状況などについて技術的に一般に可能な範囲で解析を行う必要がある。これは糖鎖が有効性、安全性にどのような影響を及ぼすのかを知るための基礎資料となる。また、目的タンパク質に期待される正しいジスルフィド架橋の形成も含めた正しい折りたたみ構造、すなわち活性高次構造を形成し、天然型(もし同一のものあるいは類似のものがあれば)に匹敵する生物活性を有することを立証することも重要である。細胞内に組み込まれた目的タンパク質に対応する構造遺伝子は特定のアミノ酸配列の作成に関する青写真ではあるが、高次構造形成に関する情報は提供しないからである。特に原核細胞を用いた組換え遺伝子産物の場合は、活性高次構造形成上の問題点が比較的多い。また仮に当初は正しい高次構造が形成されたとしても、製造過程等における化学的、物理的原因による構造変化も考えられるので、その意味でも最終産物での検討が必要である。さらに各種の理化学的、免疫化学的あるいは生物学的試験を徹底的に行って、生産物の均一性や純度あるいは目的とする生物活性を示すかどうか、その他の性状に関するデータを集める必要がある。

6. 目的物質等のタンパク質部分の構造や組成の解析目標と解析方法

目的物質等のタンパク質部分の構造や組成の解析目標としては、

- 1) アミノ酸組成分析
- 2) 末端アミノ酸及び末端アミノ酸配列分析
- 3) スルフヒドリル基とジスルフィド結合の数と位置の解析
- 4) ペプチド分析
- 5) 全アミノ酸配列分析
- 6) 高次構造解析

などの項目が挙げられる。全アミノ酸配列分析は、通常、1)~4)について可能な範囲で解析し、このデータと目的物質の遺伝子塩基配列や類縁タンパク質の既知の構造等から推定されるアミノ酸配列を照合しながら決定(推定)する。こうした目標を達成するための分析方法は、ある程度ルーチン化してきている。アミノ酸組成分析にはアミノ酸自動分析法、N-末端アミノ酸配列分析にはEdman自動分析法、C-末端アミノ酸配列にはカルボキシペプチダーゼ法が汎用される。質量分析法もきわめて有用な手段として用いられる。末端アミノ酸が複数の場合はその存在比を適切な方法を用いて明らかにする必要がある。ペプチド分析は、タンパク質のある特定のペプチド結合を適当な酵素あるいは化学試薬を用いて選択的に切断し、得られたペプチド断片を高性能液体クロマトグラフ法(HPLC)などで分離し、アミノ酸組成分析、N-末端アミノ酸配列分析、プロテインシークエンサーや質量分析(FABMS, ESIMS, MALDI-TOFMSなど:後述参照)を利用して各ペプチドのアミノ酸配列を決定する方法である。各ペプチド断片の分析結果を重ね合わせていけば全アミノ酸配列の推定につながる。最近では、タンパク質をそのまま質量分析し、質量分析計内で断片化して、その断片化スペクトルをもとにタンパク質のアミノ酸配列

を確認することが可能になりつつあるという。高次構造解析法としては、円二色性(CD)、X線回折法、核磁気共鳴スペクトル(NMR)などがある。CDは、タンパク質の二次構造を推定する上で比較的簡便な方法で、詳細な構造データが得られていないタンパク質の構造予測に関する情報を提供する上で有効であり、汎用されている。X線回折法は、質のよいタンパク質結晶の調製が鍵であるが、そのための結晶化ロボット技術の開発、さらに迅速に数多くの構造解析を行うためのハイスループット技術の開発も急速に進歩しているという。NMRは溶媒中での立体構造を知る方法として、X線回折法では得られない有用な情報を提供する。最近、Stereo-array isotope labeling法など解析手法の進展もみられている〔本章第1節参照〕。

どの程度まで詳細に、徹底して解析するかは、タンパク質におけるサイズ、構造的複雑さ、目的物質を構成する分子種の多様性などの要素とその時点での分析技術の到達度など、様々な要素によって一様ではない。組換え医薬品の場合は、一般に全アミノ酸配列を少なくとも推定できることが望ましい。

目的タンパク質以外の目的物質関連タンパク質の構造解析についても上記の要素に加えて、存在量、目的物質関連物質としてのアイデンティティの確認なども考慮に入れて合理的対応をすることになる。

7. 糖タンパク質における糖鎖の構造と機能

糖タンパク質性医薬品においては糖鎖の構造と機能に着目する必要がある。糖タンパク質における糖鎖が、標的細胞におけるレセプターとの結合性を含む生物活性の発現や調節、生体内動態、輸送のための血漿タンパク質との結合性増強、免疫学的性質、物性、安定性、溶解性などに影響を与えている事例が報告されているからである。糖

タンパク質の生物学的、免疫学的、物理的・化学的性質は、糖鎖の種類、すなわち構造上の特徴如何で影響を受ける可能性があり、また、ポリペプチド鎖中の糖鎖結合部位数や占有率、各糖鎖結合部位での糖鎖の種類や分布状況によっても影響を受ける可能性がある。また、同種の糖タンパク質であっても、ポリペプチド鎖が一部改変されたものにあつては、もとのタンパク質と同じ糖鎖結合位置に存在する糖鎖の生物学的役割が変わってくることも知られている。

もう1つの注目すべきポイントは、バイオテクノロジーにより糖タンパク質を生産する場合、種はもとより組織や細胞種が異なると、糖鎖構造も異なってくるということである。また、糖鎖付加装置を有するもとの(宿主)細胞は同じでも、組換え体などの作製方法、挿入遺伝子、培養条件等が異なれば、生産物の糖鎖構造や糖鎖付加状況は異なってくることに留意する必要がある。

糖鎖構造が適正でないタンパク質は、生体内動態や組織分布に関して本来のものと異なる挙動を示したり、天然型に対する拮抗剤的作用などの有害反応をひき起こしたり、あるいは長期連用投与の注射剤のような用法では抗原性が問題となってくる。

糖タンパク質の糖鎖構造の解析や、構造と関連付けられる特性解析は必ずしも容易なことではなかった。しかし、最近の糖鎖構造解析技術の進歩はきわめてめざましい(本章第2節参照)。こうした構造解析技術と蓄積されてきた特性解析事例を踏まえて、得られた製品における糖鎖付加状況や糖鎖構造及びその機能等との関係を技術的に可能な範囲で把握する努力が必要である。

8. 糖タンパク質の糖鎖の構造や組成の解析目標と解析方法

糖タンパク質の糖鎖に関しては、

- 1) 糖組成分析(中性糖, アミノ糖, シアル酸等)
 - 2) 結合型解析(N-結合型やO-結合型)
 - 3) シアル酸分子種分析
 - 4) 分岐鎖型, サイズ, 分布
 - 5) 糖鎖構造解析(主要糖鎖については単糖間の結合様式に至るまで解析)
 - 6) 糖鎖結合位置
 - 7) 結合位置ごとの糖鎖分布, 構造解析
- などが解析目標である。糖鎖の生物学的活性における役割等を考慮し、これらについて可能な範囲で解析することが望ましい。糖鎖部分の構造解析に必要な要素と代表的な解析方法を以下に示した。なおMSの活用法としては糖ペプチドをベースに分析することも多い。

- 1) 各種単糖分析
(化学分析, ガスクロマトグラフィー, 蛍光標識-HPLC, 強アニオン交換HPLCなど)
- 2) 糖鎖マッピングや2次元又は3次元糖鎖マッピング
(例えば, 蛍光体支援糖質電気泳動法(FACE法), キャピラリー電気泳動法(CE), ピリジルアミノ(PA)標識糖鎖のHPLCなどによる)
- 3) 糖鎖構造解析:
 - ① 各種修飾・分解(逐次酵素分解, メチル化, アセトリシス)
 - ② 分離や分取(GC, HPLC, その他のクロマトグラフィーなど)と各種解析法(MSやNMRなど)の組合せ。なおMSには, イオン化法としては主にマトリックス支援レーザー脱離イオン化法[MALDI]やエレクトロスプレーイオン化法[ESI]など, 分析計として飛行時間型[TOF], 四重極型, フーリエ変換イオンサイクロトン共鳴型分析計, イオントラップ型など, 解析法としては1段階目のMS¹での分子イオン検出, タンデム質量分析: MS²/MSⁿによるフラグメントイオン解析などがある。MALDIはTOFと, ESIは四重極型, イオントラップ型との組合せで用いら

れ、それぞれ MALDI-TOFMS, ESIMS と称する。MALDI-TOFMS は試料分取からオフラインで分析する場合に使われ、ESIMS は LC とオンラインで結んで使用される (LC/MS と称する)。その他 2 次元 NMR などの糖鎖解析法としての進展がみられる。

現在までに汎用されている動物細胞を用いて製造した糖タンパク質の糖鎖は、数種類の基本構造をベースにした様々なバリエーションであることが判明している。また、90 種類以上の標準糖鎖も存在し、かつ適切な条件下での HPLC では糖鎖構造と溶出時間に規則性があることも判明している。そのため、例えばわが国で繁用されている PA 標識糖鎖の 2 次元マッピング法を利用すれば、糖タンパク質に存在するほとんどの糖鎖構造と分布状況を推定することが可能である。結合位置ごとの糖鎖分布、糖鎖構造なども、例えば、糖ペプチド断片の LC/MS で比較的短時間で分析できるようになってきている。

9. 目的物質の理化学的手法、免疫化学的手法及び生物学的的手法による分子特性・品質特性解析

目的物質については、各種の理化学的、免疫化学的あるいは生物学的的手法による特性・品質解析を十分に行う必要がある。

- 1) 目的物質の物理的・化学的性質に関しては、
 - ① 分子量・分子サイズ
 - ② アイソフォームパターン
 - ③ 比吸光度 (モル吸光係数)
 - ④ 各種電気泳動パターン
 - ⑤ 各種液体クロマトグラフィー・パターン
 - ⑥ 分光学的性質 (例: 紫外及び可視吸収スペクトル, 円二色性)

などについて詳細なデータの蓄積が必要である。また、最近 X 線回折法や MNR による高次構造解

析手段も進展している。これらを適用できる範囲や条件には制約もあるが、適宜活用し、得られた産物についての有用な情報とすることも考えられる。

理化学的手法は目的タンパク質の確認・同定、均一性や純度の検定、定量にきわめて有用である。この目的には、各種 HPLC 法 (サイズ排除 (SE); 逆相 (RP); イオン交換 (IEX); 疎水的相互作用 (HI)) や電気泳動法 (SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法 (PAGE); PAGE; 等電点電気泳動法 (IEF); ゾーン-CE; ミセル-CE; ゲル-CE) がきわめて優れた威力を発揮し、かつ簡便な方法として繁用されている。例えば、HPLC 法は、カラムの充填剤や移動相などに適切な条件を選択すればポリペプチド鎖のアミノ酸 1 個の違いでも識別、分析できる。一方、電気泳動法は分子量、電荷の違いなどを識別できるほか、免疫化学的検出法 (例えばウエスタンブロッティング) と組み合わせれば試験の特異性はより高いものとなる。

最終製品における分子種の均一性に関しては十分な解析を行い、その実態をきちんと把握しておく、製造ロットが変わってもその恒常性を保証することが重要である。先に述べた目的物質等における分子構造上の不均一性はそのものの品質を規定するものであるため、この不均一性の程度及びプロフィールを解析する必要があるが、その最も有力な武器になるのも HPLC 法及び電気泳動法である。目的物質等の不均一性のパターンを定義し、非臨床・臨床試験に用いたロットのパターンとしかるべき範囲で一貫していることを証明し、さらに承認後の製品のロットごとに不均一性のパターンがしかるべき範囲で一貫していることを保証することで製品の品質の恒常性を確認することができる。製品の不均一性のパターンのしかるべき範囲での一貫性 (類似性が高く同等・同質とみなせること) が証明されれば、個々の分子種の生物活性、有効性及び安全性 (免疫原性を含む) を評価する必要は必ずしもないケースもある。なお、これら工程の変更や分解物・変化物生成により、

非臨床及び臨床試験に用いた製品で認められていたものと不均一性パターンが同等・同質と説明できる範囲を越えて異なってしまった場合には、その変化がもたらす影響について評価する必要がある。

2) 目的物質の特性・品質解析には、理化学的手法による解析に加えて、生物学的手法あるいは免疫化学的手法による検討が不可欠である。そのアプローチ法は個々の製品の種類や特性とアッセイ系の特徴を最大限考慮した適切で合理的なものである必要がある。

免疫化学的手法の活用は、目的物質がモノクローナル抗体等の場合には免疫化学的特性を解析する手段として必須である。抗体が目的物質の場合、その免疫学的性質を十分に特性解析する必要がある。精製抗原及び抗原の特定の領域と抗体との結合試験を行い、可能な限り、アフィニティー(1価の抗原結合部位と1価の抗原決定基との間での結合の強さ)、アビディティー(多価抗体と多価抗原との結合の強さ)及び(交叉性反応を含む)免疫反応性を明らかにするべきである。さらに、関連するエピトープを有する標的分子を生化学的に明らかにし、できればエピトープ自身も明確にする。モノクローナル抗体以外が目的物質の場合でも、当該タンパク質上にある様々なエピトープを認識する適切な抗体(類)が入手できれば、免疫化学的方法(例えば、ELISA、ウェスタン・ブロット)は、目的物質の同定や均一性、純度あるいは含量を試験する上で有用である。抗原抗体反応ではタンパク質の高次構造もある程度反応性に影響するので目的物質の高次構造に関する情報もある程度得ることも可能である。しかし、抗原抗体反応に関わるポリペプチド鎖中の領域と生物活性に関わる領域とは必ずしも同一とは限らないので、免疫化学的試験の結果から目的物質の生物活性に言及することは慎重でなければならない。一方、特異的中和抗体を用いて目的物質等の生物活性の抑制や、レセプターなどへの結合性の阻害を検討することは目的物質等の同一性確認の精度を

一層高めることになる。

目的物質の免疫化学的性質が、精製、確認試験、純度試験、定量法、体内動態試験等に利用されている場合には、目的物質と抗体に関する全ての関連情報を提供する必要がある。例えば、

- ① イムノアッセイ、免疫電気泳動、抗体中和法等の適切な方法を用いて検討した目的物質とこれに特異な抗体との反応性
- ② 類似物質に対する抗体が比較的容易に入手できる場合に、その抗体と目的物質との反応性
- ③ 類似物質が比較的容易に入手できる場合に、目的物質に対する特異抗体との反応性

などが挙げられる。

3) 生物学的手法は、まず何よりも目的タンパク質を特徴付ける生物学的性質や生化学的性質の解明に必須である。例えば、酵素の場合には酵素化学的性質、モノクローナル抗体の場合には標的抗原に対する特異性や組織学的結合性、ワクチンの場合には免疫原性、ホルモンの場合には目的とするホルモン活性、サイトカインの場合にも目的とするサイトカイン活性などである。一方、ホルモンやサイトカインなどは目的とする性質以外にも多彩な生物学的作用を有することが知られていることが多く、ケースごとに適宜、適切な検討あるいは文献からの情報の提供が必要である。

生物学的手法は、生物学的機能を指標とする確認・同定法や比活性を指標とする純度検定法、力価測定のための定量法などに活用される。さらには活性高次構造形成あるいは保持の確認や、活性を指標とする安定性評価にも有用である。

生物学的手法には、動物を使用する *in vivo* 法と、培養細胞での応答や酵素反応速度解析、あるいは免疫学的相互作用などの生化学的反応性を指標として用いる *in vitro* 法がある。基礎研究の段階、開発段階では、両法を駆使した詳細な検討が必要である。品質管理を目的とするような試験などの場合、従来は *in vivo* 法がよく使われていた

が、最近では動物福祉の問題や、細胞生物学の発展を踏まえたより簡便で正確な *in vitro* 法によるアッセイがむしろ主流になってきている。しかし、*in vivo* 法による生物活性には投与後の体内動態及び標的細胞(標的分子)との相互作用が反映されるが、*in vitro* 法で得られる生物活性は体内動態に係わる要素が反映されないため、両測定結果が相関しない場合があることに留意すべきである。その典型的な例は糖タンパク質であり、糖鎖の状態如何では、*in vivo* 法と *in vitro* 法で得られた生物活性が逆相関になることもある。

一般に、ある細胞基材由来タンパク質性医薬品の生物学的特性に基づく生物活性を定量的に表す尺度として「力価」を用いる。力価測定に用いられる生物活性が必ずしも臨床の場でのそれと同様あるいは類似のものである必要はない。しかし、臨床上期待する効果と生物学的試験における活性との相関については、薬力学試験あるいは臨床試験において確認しておく必要がある。

4) 純度については、

- ① 目的物質の理化学的純度
- ② 比活性(製品の mg あたりの生物活性単位)を主な指標とする生物学的純度

さらに、

- ③ 工程由来不純物及び混入汚染物質

の観点を踏まえて品質評価する。このうち、目的物質の理化学的純度に関しては、目的物質が非常に多数の分子種からなる不均一なものであるケースも含めて、目的物質の種類に応じてその基準は一樣ではなく、また、用いた試験方法にも大きく依存することになる。比活性も用いた試験方法に大きく依存している。結局、タンパク質性医薬品の純度は、各種の分析方法の組み合わせにより評価することになる。

5) ここで得られた物理化学的、免疫化学的あるいは生物学的諸性質は、品質管理試験のほか、非臨床試験や臨床試験における有効成分の使用量の把握、体内動態や作用の追跡、作用機構の解析

などのための基礎資料としてきわめて有用である。

10. 有害因子や不純物混入の可能性に関する検討

組換え医薬品や細胞培養医薬品の品質確保、安全性の観点から特に留意する必要があるとされていることの1つが不純物の問題である。混在が予想される不純物には大別して外来性の有害因子、製造工程由来不純物と目的物質由来不純物の3種類が考えられる。

このうち外来性の代表的有害因子である微生物(細菌、真菌、マイコプラズマ、ウイルス)や発熱性物質の混在による安全性上の懸念に関しては適切な試験方法あるいはクリアランス評価試験などにより、その時点での可能な限りの安全性が保証される必要がある。また、外来性の化学物質や生化学的物質(例えば、微生物由来プロテアーゼ)なども汚染物質としてその混入は厳に避けるべきである。これらは、適切な工程内管理試験や処置基準値(社内で定めた基準値)あるいは原薬や製剤の規格及び試験方法により適正に管理する必要がある。なお、ウイルスやマイコプラズマの汚染に関しては、処置基準値の概念は適用しない。

製造工程由来不純物と考えられる主なものには生産細胞由来のタンパク質、核酸(宿主ゲノム由来 DNA、ベクター由来 DNA、あるいは細胞由来全 DNA など)、その他の細胞成分、培地由来の不純物(遺伝子発現誘導剤、抗生物質、血清、その他)、目的物質の抽出、分離、加工、精製過程で用いた各種試薬(例: 酵素、臭化シアン、グアニジン、酸化剤や還元剤等)、無機塩(例: 重金属、ヒ素、非金属イオン等)、溶媒や抗体カラムなどに由来する不純物、その他製造工程に使用された各種資材から漏出する可能性のある物質等が挙げられる。細胞や培地由来のタンパク質などの混入が安全性確保の点から問題とされる主な理由の1

つは、これら不純物が免疫原性物質となり得る可能性が考えられるからである。また大腸菌由来のポリペプチドのように、それ自身が免疫原性を示すというよりもアジュバントとして目的産物の免疫原性を修飾する可能性があることについても考慮しておく必要がある。宿主由来タンパク質によるアジュバント効果はhGHの開発初期に大きな問題となったが、当然のことながらその後は問題とならない量にコントロールされているので今後の開発にあたっては参考となる。さらに培地に用いる抗生物質などはアレルゲンになる可能性もあるので注意が必要である。とくにラクタム系のもはそもそも使用しないよう勧告されている。これらの不純物を検出し、試験する方法としては一般に免疫化学的方法が多用される他、HPLC法や電気泳動法も必要に応じて用いられる。一方、細胞基材由来DNAは、継代培養細胞株に存在する可能性のあるオンコジーンなどが医薬品中に混入して人体に悪影響を及ぼすことを危惧する議論の中心課題として問題となってきた。最近では、様々なデータの蓄積に伴い、初期ほどの危惧はなくなり、1投与あたり10 ngが限度値の目安とされているが、実績としてより低い限度値が達成できている場合には、あえて10 ngという限度値にとらわれることはない。試験法としては、一般にDNAハイブリダイゼーション法がよく用いられる。

一般に不純物として問題となる可能性があるものについては、精製工程における分離状況や除去効率を明らかにし、必要に応じて最終製品での許容限度を定め、適切な試験を行ってチェックする必要がある。実験室スケールでいわゆるスパイク試験を行って、不純物の精製工程における分離状況や除去効率が満足できることをより明確に立証したり、工程内管理試験を行うことで最終製品での混在許容限度試験を実施しないというアプローチも考えられる。

目的物質由来不純物としては、目的物質を直接生産する過程で生じた副生成物類(切断体、S-S

結合ミスマッチ体など)と、目的物質の二次的修飾の結果生じた

- ① 凝集体(二量体, 多量体)
 - ② デスアミド体などの分解物
 - ③ 酸化生成物
- などが考えられる。

これらの不純物の混在状況については、製造方法や物質特性を考慮した上で試験対象を定め、HPLC法、電気泳動法など適切な方法による検討を行い、その実態に関する詳細なデータを蓄積しておくことが必要である。その上で、最終製品での許容限度を定める必要のあるものについては、その検出や混在量測定のための適切な試験を設定しておく必要がある。項目の選定や基準値の設定にあたっては合理的に説明すること。基本的には臨床試験に用いられた製品での品質がベースになるが、エンドトキシン等安全性上の懸念やその対応策が周知であり、明確なものについてはその旨合理的な説明を付した上、局方での基準値の考え方に沿ってもよい。

11. 製造工程の妥当性評価・検証とプロセスコントロール

組換え医薬品や細胞培養医薬品の特性・品質確保の最も基礎となるのは、前項で述べた製品の特性・品質解析結果であることはいままでもない。この結果は、同時に製造工程全体の妥当性に関する最も重要なデータでもある。同時に、医薬品としての承認後、製品面レベルで将来にわたって継続的に同一の特性・品質を有する医薬品を供給していくための規格及び試験方法の設定に際して最も基礎となるデータを提供する。

しかし、組換え医薬品や細胞培養医薬品が複雑な製造工程の産物であり、かつ製造工程には望ましくない有害因子が混入する可能性があること、製品が複雑な構造や性質を有し安定性にも乏しい

ものであることなどを考え合わせると、開発ステージでの製品の特性・品質解析結果や規格及び試験方法のみに依存して品質の恒常性確保を望むことができないことは明らかである。そこにプロセス評価やプロセスバリデーションに基づくプロセスコントロールの概念の導入と実施の必然性が生じてくる。まず、製造工程は適切に設定される必要がある。製造工程の最終的な設定やプロセスコントロールの策定に至るまでには製品開発段階で試行錯誤が重ねられるものと思われる。この間、予備的なプロセス評価や検証、製品の予備的な分子特性や品質特性の解析が実施されるであろう。これらの過程を経て、承認申請に必要な各種データをとるための製品を生産するものとして、しかるべき製造工程が確立される。最終的に設定された製造工程については、まず、その工程により得た製品の特性・品質等を徹底的に解析し、評価することにより設定された製造工程の妥当性が示される必要がある。この製造工程は、さらに継続的に一定の品質の医薬品を製造できるという点に関して評価あるいは検証される必要がある。その継続性を保証することは、医薬品の品質の恒常性確保に寄与することにつながる。わが国では、承認申請時に提出される製品の特性・品質解析、製造工程の妥当性評価・検証及びプロセスコントロールの策定、規格及び試験方法の設定、さらには安定性等に関する試験及び評価は、パイロットスケールで実施されることも少なくない。市販のための実生産スケールのバリデーションとしてさらに確認・検証すべき事項及び追加すべき事項は、承認審査により当該医薬品の品質、安全性及び有効性と全体としての有用性が評価されることと並行して、あるいは評価された後に実施されることになる。ただし、特性・品質解析やプロセス評価を実生産スケール及びそこで得られた製品について、すべてパイロットスケールでのそれを繰り返し実施すべきということではない。製品そのものについては規格及び試験方法で確認すること、工

程そのものについては、製品が規格及び試験方法に適合していること及び、品質確保上のキーポイントのチェック、必要に応じてプロセス評価・検証の確認とプロセス評価・検証で明らかにされたチェックポイントの確認、スケールアップした施設、設備などハード面でのバリデーションなどが主な事項になると思われる。ただし、ウイルスクリアランス試験や不純物のスパイク、クリアランス試験のように、実生産スケールや実際の製造場所、直接の設備・装置で実施できないプロセス評価試験もある。

組換え医薬品等の品質確保及びその恒常性確保に寄与する製品の特性・品質解析、製造工程の妥当性評価・検証、プロセスコントロール、規格及び試験方法等は相互に関連し合っているが、その関係付けを図2にまとめた。

プロセスの妥当性検証・評価の一部を形成するもので、承認申請時において、製品の品質保証や品質の恒常性を立証する上で、最も直接的に関わるのが、製造・精製工程のプロセス評価・検証である。その目的は、採用された製造・精製工程が、細胞基材調製や細胞培養段階で品質、安全性上の問題となる要因をかかえていないか、目的物質についてはその生物学的特性(や免疫学的特性等)を損なうことなく効率よく純化する能力を有すること、その一方で、有害因子や不純物については最終産物に迷入・混入して安全性上問題となることのないよう許容できるレベルにまで排除されているか、また偶発的に迷入することがあったとしてもこれらを排除できる能力を有することができるかを立証し、その恒常性があるかを評価・検証することにある。この恒常性を日常的にモニターする方策の1つとして製造工程のある段階において工程内管理試験や規格が設定される。こうして工程中で迷入の可能性がある有害因子や最終目的産物に混入が予想される不純物などに関し、その可能性の有無、除去状況又は混在状況等が示されることになる。また、それらを踏まえて、最終製品

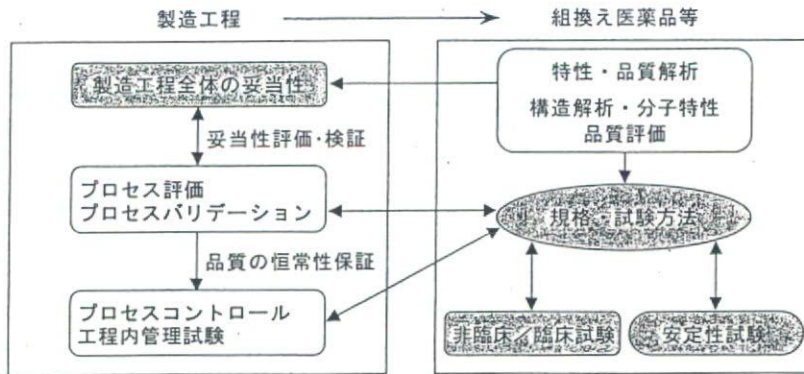


図2 バイオ医薬品の品質確保とその恒常性確保に寄与する製品の特性・品質解析、製造工程の妥当性評価・検証、プロセスコントロール、規格及び試験方法等の関係付け

(原薬や製剤)段階での規格の設定の必要性や規格値が定められることになる。

組換え医薬品や細胞培養医薬品の品質確保に関し、承認申請時に、

- ① プロセス評価・検証
- ② 製造工程の適切な段階における工程内管理試験や規格の設定
- ③ 原薬及び製剤の規格

この3つのアプローチを相互補完的に合わせて、全体として目的医薬品の品質を保証する方策を示すことの重要性は、国際的な合意事項として明確にされてきているところである。この方策によれば、工程内管理試験で設定した規格・試験に関しては、最終製品での規格及び試験方法で設定する必要はなく、重複を避けることが可能となる。

ここで、プロセス評価・検証試験には2つのタイプがあることに簡単にふれておく。

1つは、一般的な意味で用いられるもので、やがてプロセスバリデーションに至るもの、すなわちプロセスバリデーションの重要な要素の1つとしてのプロセス評価試験である。これは、適切な実験室モデルで重要な操作に関する項目及び性能に関する項目、並びに判定基準を明らかにするために行う試験であり、製造工程を設計・構築し、それを評価するための検討の一環として実施され

る。これはやがてパイロットスケールでの製造工程の妥当性に関する評価や実生産スケールでのバリデーション試験の基礎となる。パイロットスケールでの製造工程の妥当性に関する検討結果は、承認申請審査において、当該医薬品が品質面からみて適格であることを評価する上で必要なものとなる。実生産スケールにおけるバリデーション試験では、重要な操作に関する項目及び性能に関する項目、並びに判定基準を確立するとともに、操作パラメータ(例：温度、時間、pH、流速、緩衝液の伝導率など)が許容基準内にコントロールされているか、性能パラメータ(例：タンパク質濃度、比活性、各工程での収率、細胞生存率、細胞増殖速度など)が適合しているかを立証することになる。

もう1つは、パイロットスケールや実生産スケールでバリデーション試験を実施することが不可能、あるいはGMP上の制約で、製造現場とは別の施設で実生産の状況を可能な限り反映させ、スケールをダウンさせたモデル実験としてやらざるを得ないプロセス評価試験である。このタイプのプロセス評価試験の典型的な例は、ウイルスクリアランス試験や、スパイクした細胞由来のタンパク質、あるいはDNAの除去効率に関する評価試験である。これは、組換え医薬品等の承認申請

時に必要かつ特徴的な評価試験で、バイオプロセス評価試験ともいえる。ICHガイドラインでは、クリアランス試験と称している。

12. 規格及び試験方法(ロットごとの品質試験)

開発研究の段階で特性・品質、有効性、安全性について詳細に検討された組換え医薬品や細胞培養医薬品は、最終的にその有用性が評価されると製造販売が承認され、臨床の場に供されることになる。この承認された医薬品の特性・品質、有効性、安全性は、製品レベルでは医薬品の規格及び試験方法によって維持、保証されることになる。すなわち、製造ロットごとに、承認時に定められた方法により試験を行い、定められた規格の適合性についてチェックを行うことで品質の恒常性を図ることになる。

したがって開発段階で明らかになった組換え医薬品や細胞培養医薬品の特性・品質面での解析結果は、適切にロットごとの品質試験にも反映させる必要がある。この際、医薬品の安全性及び有効性を確保するのに有用な、分子特性及び生物学的な特性並びに品質特性に焦点をあてる必要がある。そのためには少なくとも、

- ① 目的物質の同一性・構造確認に関する試験法の設定
- ② 目的物質の均一性もしくは目的物質(有効成分)が複数の分子種からなる場合はそれらの構成比がほぼ一定であることの保証に関する試験法の設定
- ③ 目的物質のタンパク質化学的純度の保証に関する試験法の設定
- ④ 製造工程由来不純物や目的物質由来不純物にとくに配慮した純度試験の設定
- ⑤ 生物活性や生物学的純度(比活性)の保証に関わる試験法の設定

などに留意する必要がある。

前項でもすでに部分的に述べたように、原薬及び製剤の規格及び試験方法の設定は、原材料及び添加剤の管理、工程内試験、工程の評価又はバリデーション、GMPの遵守、安定性試験、ロットの恒常性についての試験などを含めた品質確保に関わる方策全体の要素の1つである。これらの要素をすべて組み合わせて医薬品の適切な品質が保証される(図3)。

規格及び試験方法の項目は医薬品の特性解析を目的として選択するというより品質の確認を旨として選択する。したがって、規格及び試験方法として、特定の品質特性についての試験を採択したり除外したりすることに関する根拠とその妥当性を明確にする必要がある。なお、科学的に妥当性のある規格及び試験方法を設定するにあたっては、

- 1) 製造工程
- 2) 安定性
- 3) 非臨床試験及び臨床試験のデータ、
- 4) 分析法

などを勘案する必要があるとされている。すなわち、まず第1に、規格及び試験方法は、製造の恒常性を立証するために使用したロットから得られたデータに基づいて設定される必要がある。規格及び試験方法と製造工程とを関連付けて考えることは重要なことであり、特に目的物質関連物質、目的物質由来不純物及び製造工程由来不純物については重要である。製造工程の変更や保存中の分解物・変化物の生成により、不均一性パターンが非臨床試験及び臨床試験に用いた製品でみられていたものと異なってしまうことがある。その場合にはその変化がどのような意味を持つかについて評価する必要がある。第2に、原薬及び製剤の分解や変化は、保存中に生じる可能性があるが、規格及び試験方法を設定する際には、これらについて考慮する必要がある。細胞基材由来タンパク質性医薬品は本質的に複雑な分子であるため、安定性面での特性をそれだけで明らかにすることがで

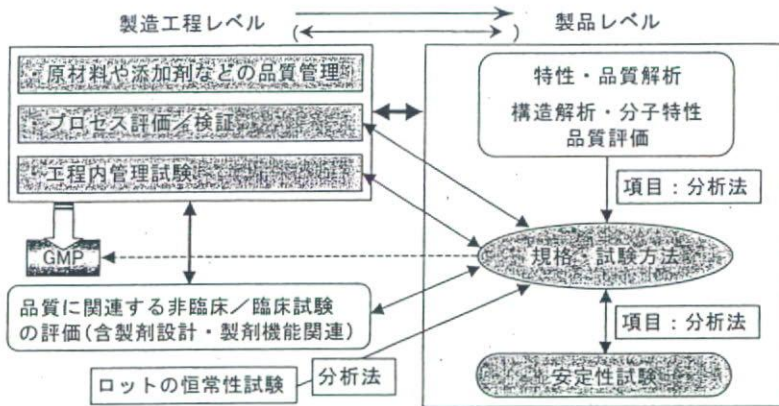


図3 バイオ医薬品の品質確保に関わる方策全体を構成する要素

きるような安定性評価試験法やパラメータはない。したがって、開発者としては、当該医薬品の同一性、純度及び力価の変化などを総合的に捉えることができる安定性評価指針を考える必要がある。そして、この安定性評価指針に基づいて実施した試験の結果により、製品の品質の変化を確実に捉えることが必要である。どのような試験項目を含めるかは製品によって異なる。本件については、ICH ガイドライン「生物薬品(バイオテクノロジー応用製品/生物起源由来製品)の安定性試験」を参照するとよい。第3に、規格及び試験方法は、非臨床及び臨床試験に使用したロットから得られたデータに基づいて設定される必要がある。実生産規模で製造された検体の品質は、非臨床試験及び臨床試験に使用したロットの品質に相当するものである必要がある。第4に、規格及び試験方法の設定には分析法を勘案する必要がある。細胞基材由来タンパク質性医薬品におけるきわめて重要な品質特性には、力価、目的物質関連物質、目的物質由来不純物、及び製造工程由来不純物の種類や存在量などがある。このような特性は、様々な分析法により評価できるが、分析法が違えば結果が異なる。医薬品開発の過程においては、医薬品の開発状況と平行して分析法が発達していくこともまれではない。このため、開発中に得ら

れたデータが、承認・許可の申請書を提出した時点で得られたデータと相関していることを確認することが重要である。

規格及び試験方法に採用する試験方法の選択は、製品により異なるが、選択した試験方法の妥当性や規格値/適否の判定基準の適合範囲を設定するために用いた根拠を明らかにする必要がある。個々の製品の規格値/適否の判定基準は、非臨床や臨床試験に用いたロットから得られたデータ、製造の恒常性を示すために用いたロットから得られたデータ、及び安定性試験データ、並びに製品の開発段階で得られた適切なデータに基づいて設定し、根拠を示す必要がある。

全ての原薬に適用されると思われる規格及び試験方法の項目として、

- 1) 外観・性状
 - 2) 確認試験
 - 3) 純度及び不純物
 - 4) 力価
 - 5) タンパク質量
- などがある。

確認試験は、その原薬にきわめて特異的である必要がある。また、分子構造上の特徴やその他の特有の性質に基づいている必要がある。同一性を確認するためには、2種類以上の試験(理化学試

験、生物学的試験あるいは免疫化学試験)が必要であろう。確認試験は定性的なものでもよい。確認試験の設定には、製品の特性解析のためによく用いられる試験法のうちのいくつかが、そのままあるいは目的に沿うようモディファイして用いられる。

純度及び不純物に関連して、細胞基材由来タンパク質性医薬品の絶対的な純度を決定するのは難しく、また、その結果は試験方法に依存する。このことから、原薬の純度は、通例、分析方法の組み合わせにより評価される。分析方法を選択し、最適化する際には、目的物質、目的物質関連物質及び不純物を相互に分離することに重点をおく必要がある。

原薬中の製造工程由来不純物は、製造工程の適切な管理によりこれらの不純物を最小限にする必要がある。

原薬中の目的物質由来不純物に関する試験方法の選択と最適化に際しては、目的物質及び目的物質関連物質を不純物から分離することに重点をおくべきである。不純物の規格値は、適宜、単独量あるいは合計量で設定する必要がある。工程内管理試験などでコントロールされるような不純物については、最終製品段階で必ずしも規格値を設定する必要がない。

特異的な生物活性が特徴の細胞基材由来タンパク質性医薬品の原薬や製剤の規格及び試験方法のうちのきわめて重要な項目として、バリデートされた適切な力価試験が挙げられる。しかし、適切な力価試験を製剤について設定していれば、原薬の段階での定量的な評価には、代替試験法(理化学的試験法あるいは生物学的試験法)でも十分な場合がある。この場合の生物学的試験法とは、信頼限界における厳密性を要求せず、ある程度広くてもよい方法を指している。逆に、適切な力価試験を原薬について設定していれば、製剤の段階での定量的な評価には、代替試験法(理化学的試験法あるいは生物学的試験法)でも十分な場合がある。ただし、そのような設定を行う場合にはそ

れが妥当とする理由を示す必要がある。原薬の比活性の測定により、さらに有用な情報が得られる場合もある。

複数の同種同効医薬品を生物学的方法で測定し、力価で表示する場合には、医療現場の混乱を避け、相対比較ができるように、可能な限り生物活性単位表示の統一と力価測定法の標準化に努めるべきである。標準的試験法の簡便、高精度化も目指すべき方向である。わが国では、組織プラスミノゲン活性化因子(t-PA)、トロンボモデュリン、エリスロポエチン等の標準的試験法が開発された。

その一方で留意すべきことは、組換え医薬品等の場合、生物活性の保証を主な柱とする従来の方式からタンパク質化学的性質の保証をもう1つの柱にすえることが必然的な流れとなってきたということである。技術面でも、組換え医薬品や細胞培養医薬品の開発に呼応してタンパク質に関する分析手段が急速に発展してきたので、こうした対応が現実的に可能になってきた。こうした背景のもとで、同一性の確認や純度検定に際しては、しばしば高分子タンパク質中のアミノ酸1個が置換した誘導体が識別あるいは検出すべき対象となり、また、安定性試験においても、タンパク分子中のわずかな変化、例えば、ある特定のアミノ酸残基の脱アミノ化反応や酸化反応などですら試験対象となってきた。タンパク質性医薬品の品質確保や評価のあり方も、物性面ではまさに有機化学薬品に近いような精密度を要求されるという新たな局面が生まれてきているといつてよい。この延長線上で、後述するように生物学的試験法から理化学的試験法へ切り替えることが試みられている。

理化学試験法により原薬や製剤中の原薬を定量する場合には、通例タンパク質量を適切な定量法を用いて測定し、質量で表す。製品の製造が力価に基づいて行われる場合には、別途あえてタンパク質量を測定する必要はない。

製剤の規格及び試験方法として全ての製剤に適用されるであろう項目には、通例、原薬のそれと

同様に、

- 1) 外観・性状
- 2) 確認試験
- 3) 純度及び不純物
- 4) 力価
- 5) タンパク質量

などが挙げられる。これらに加えて関連する剤形には薬局方上の規定が適用される。薬局方に収載されている代表的な試験法には、無菌試験、エンドトキシン、微生物限度試験、実容量試験、不溶性微粒子試験、重量偏差/含量均一性試験(製剤均一試験)及び凍結乾燥剤の含湿度があるが、これら以外の試験も適用できる。重量偏差/含量均一性試験(製剤均一試験)については、工程管理試験として実施し、相応する規格値を設定するという方策でもよい。

製剤の確認試験は、ほとんどの場合1種類の試験で十分であると考えられるが、製品によっては同一性の確認に2種類以上の試験(理化学試験、生物学的試験あるいは免疫化学試験)が必要となる場合もある。

不純物は、製剤の製造の際や、あるいは保存中に生成したり、増加したりする可能性がある。これらの不純物は、原薬そのものにおいて生成する不純物や製造工程由来の不純物と同じものか、製剤化中あるいは製剤の保存中に限って生成する分解物・変化物のいずれかである。もし不純物が定性的にも、定量的にも原薬中のものと同じであるということであれば、試験する必要はない。もし不純物が製剤の製造中あるいは保存中に持ち込まれるか生成することがわかっている場合は、これらの不純物のレベルを測定し、規格値を設定する必要がある。規格値と分析方法については、製剤に関するそれまでの経験に基づき、製剤の製造中あるいは保存中の原薬の変化を測定できるよう開発し、その設定理由を示す必要がある。

その他、製剤の機能を評価する上で、物理的性状及び他の品質特性の測定が重要となる場合が多

い。このような試験の例としては、pH、浸透圧がある。ただし、pH、浸透圧を規格及び試験方法に設定する必然性や意義がどの程度あるかについては、検討の余地がある場合が少なからずあると思われる。

特殊な剤形の場合は、上記の試験の他に追加試験が必要な場合がある。

13. 品質管理における生物学的試験法から理化学試験法への切り替え

ヒト成長ホルモンやインスリンの品質管理における定量法は、従来、生物学的試験法で行われていたが、生物活性成分のみを分離、測定できるHPLC法が開発され、これに切り替えられることにより、わが国ではもはや生物活性試験を行う必要がなくなった。品質管理における生物学的試験法から理化学試験法への切り替えへの要件と戦略としては、

- 1) 開発段階での徹底的な生物学的特性解析の実施
- 2) 製造方法の明確化と一定性の確保
- 3) 生物活性を保持する目的有効成分を選択的に識別し、定量することが可能な試験系の確立が挙げられる。このうち、3)に関する実証的研究においては、①各ロットにおいて生物活性(力価)と理化学試験測定値(タンパク質量)が相関することの証明、②一旦理化学試験法に切り替えると、以降は、その測定結果(タンパク質量)が同時に生物活性(力価)を反映したものでなければならないことの確認、すなわち理化学試験測定値(タンパク質量)の中に生物活性のないものは含まれず、生物活性のあるものは理化学試験測定値に含まれることの確認、③具体的には、製造過程、保存中に製品にどのような事態が生じて、生物活性のあるもののみを選択的に識別し、定量可能な理化学試験法の確立が必要である。わが国では、ヒト成長ホルモンやインスリンの場合もこのような考

えに基づいて検討が行われた。その結果、前者については、適切な条件下でのサイズ排除(SE)-HPLCのhGHに相当するピークから分取した試料は、実験誤差の範囲内でいずれもヒト成長ホルモン有効成分として満足できる活性を有することが確認され、後者についても、適切な条件下でのRP-HPLC法は、生物活性を有するインスリンのみを選択的に識別、定量できることが判明した。

ICHガイドラインでも同様の趣旨のことが述べられている。すなわち、以下のような場合にのみ、製品の生物活性を測定する生物学的試験を理化学的試験法に置き換えてもよいであろうとしている。

- 1) 当該理化学的方法により高次構造を含む医薬品に関する十分な物理化学的情報があますところなく得られ、また生物学的活性との適切な相関が証明されていること。

さらに、

- 2) 十分に確立された製造実績があること。

14. 標準品、標準物質

組換え医薬品や細胞培養医薬品の特性・品質評価の基準となる物質の設定に関して最も理想的なのは国際標準品あるいは国内の統一標準品が制定されているケースである。しかし、組換え医薬品等の開発テンポは早いので、開発時にこうした公的標準品が制定されていることはまれである。また、複数のメーカーにより、それぞれ異なるソース(種細胞)から開発された同種、同効製品に対して公的標準品を制定しようとする場合、最も大きな問題となるのは、標準物質と対象となる製品との化学的及び生物学的同一性である。複数の同種製品が相互に、化学構造的に同一ではなく、目的とする理化学的試験に不適切な場合は、共通の標準品を制定することはできない。相互の化学的構造上の微妙な差異が各種の生物学的作用に影響を及ぼさないのであれば、アッセイ系の標準化や力

価表示法の統一も含めれば共通の力価測定用標準品を制定できる可能性があるが、化学的構造上の差異が各種生物学的作用の差異として現れるようなケースでは共通の標準品はできない。

公的標準品が存在しない場合、医薬品開発者としてはとりあえず、自家標準物質を確立する必要がある。その場合のアプローチはおよそ次のようなものであろう。

- 1) 開発ステージにおける目的物質の解析で構造、組成、諸性質などについて徹底的に吟味されたロットのものをリザーブして第1次標準物質とする。これは、非臨床試験、臨床試験で使用されたロットの品質と同等もしくはそれ以上のものでもあることが望ましい。

- 2) それが困難な場合、あるいはストック切れで更新を必要とする場合は、1)の手順と基準で得られたものとその物性、純度などにおいて同一、同等であることを客観的に立証できる試験を行うよう適正なルールを定め、これに適合したものを第1次標準物質とする。なお、標準物質の力価に関しては、当初の定義あるいは各ロットごとに正確な検定で得られた一定の値とし、範囲で定めることはしない。

- 3) 第1次標準物質から試験目的に則した評価法で常用標準物質を確立する。

- 4) 標準物質とは、あくまで試験目的に則した形でその規格、基準などが定められるべきものである。例えば力価測定用の標準物質の場合には、その標準物質について、同一性と正確な力価が定まっていることが重要で、厳密なHPLC的純度は必ずしも要求されない。一方、HPLC用の標準物質の場合には、厳密なHPLC的純度が要求される。

- 5) 組換え医薬品や細胞培養医薬品はタンパク質製剤であるのでその安定性に問題があるが、標準物質はその保存期間中なんらの変化もしないことが絶対の前提条件である。

- 6) 標準物質は通常、バイアルの内容物を所定量の適当な溶媒に溶解すれば所定の力価(質量)を示

すよう製造する。表示値は、バイアルに分注・充填後に力価検定(あるいは質量定量分析)を行い、一定値を定める。範囲では定めない。この場合、再溶解したとき、容器の材質や溶媒の性質によって標準タンパク質が容器に吸着して表示通りの力価(質量)を示さない可能性がある。また、溶解後の安定性に問題はなくとも、経時的に容器への吸着が増す場合もある。標準物質製造時には、凍結処理や製剤化がどのような影響を起すかという問題とともに、容器の材質や標準物質溶解液の種類、あるいは溶解後の取り扱い方について十分な吟味が必要である。

15. 組換え医薬品や細胞培養医薬品の安定性試験

組換え医薬品や細胞培養医薬品の安定性試験の目的は、

- 1) 品質保証可能な保存条件、保存期間の設定
 - 2) 医薬品が経時的にどのような変化をうける可能性があるか
- について検討していくことにある。

試験の実施計画や評価に際して第一義的に重要な点は、実保存期間、実保存条件での安定性試験データが、貯法を決める場合はもとより、分解物の確認やその後の処置などのことを考える際にも、基本になるということである。換言すると、申請しようとする精密な範囲の保存温度と保存条件で長期安定性試験のプロトコルをつくり、データを評価すべきであるということである。有効期間が化学薬品に比較して短期間というケースも考えられるが、それに応じて経時変化をモニターするための試験間隔を短くする必要がある。

試験の実施にあたっては、対象となる製品の同一性、純度、生物活性における変化を検出/測定できる検証された適切な理化学的試験方法(各種電気泳動法、高分解能クロマトグラフィ、ペプチ

ドマッピングなど)、生化学的方法、免疫化学的方法を駆使してデータを集積する必要がある。分解物・変化物に関しては、長期保存試験で有意に生成するような分解物等がある場合にその特性解析や定量、安全性上の問題について考慮する必要がある。その許容量は、前臨床や臨床試験で用いた試料でのレベルを勘案して設定し、その根拠を明らかにする必要がある。

16. 品質確保にあたっての留意点と方策のまとめ

ここで改めて、品質確保にあたっての留意点と方策をまとめておきたい。

まず、医薬品としての品質確保を考えるときのキーポイントは、「医薬品とは医療に資する観点から有効性、安全性という面で意義付け、特徴付けられたものである」ということを前提とすべきという点である。単なる化学物質と医薬品との明確な差異はそこにある。したがって評価された有効性、安全性を体現する物質としての特性がどのようなものか、あるいはどうあるべきなのか、どのように維持管理していくべきかが医薬品の品質方策としてのキーポイントである。品質の、品質による、品質のための方策を第一義とするのは医薬品にとっては適切ではない。品質確保自体は医薬品を医薬品たらしめる手段であるが終局の目的ではない。品質確保・保証・管理は、あくまで「最終製品の有効性・安全性確保とその継続的保証という第一義的な目的のための手段」ということである。

したがって、品質確保において直接的な関心事としての「品質に影響を及ぼす」とは、有効性・安全性に影響を及ぼすか否かを基準に考えるべきであるということを確認しておく必要がある。

この点に立脚すると、「確保すべき品質の範囲は、有効性/安全性が認められた製品の品質特性

に基づき、定められる」ということになる。この品質特性が種々の製法関連要素により規定されることはいうまでもない。

どう恒常的に確保すべき品質を維持するかということであるが、「効果的に品質確保(安全性・有効性の継続的保証)を図る」には、極端には製品レベルでの試験や管理を徹底して実施することのみでも可能な場合もある。しかし最も合理的には、「製品レベルと製造工程レベルでの相互補完的な恒常性維持・管理方針がポイント」となる。つまり、「有効性/安全性確保に必要な製造工程部分・工程管理法、規格及び試験方法等を合理的、効率的にバランスよく設定して目的を達成する、それをGMPで管理し、変更があれば必要な検証を実施する。」というのが品質確保全体を通したコンセプトと方策であると考えられる。

次に、前出の図3を参照しながら医薬品品質確保方策全体の中で製品関連要素と製造工程関連要素が果たす役割と位置付けの再確認をしておきたい。

製品レベルでの品質確保の中核は規格及び試験方法であるが、これを適正に設定するためには製品レベルでの他の要素(特性・品質解析、安定性試験、ロットの恒常性についての試験など)、製造工程レベルでの様々な要素(原材料及び添加剤の品質管理、プロセス評価/検証、工程内管理試験など)、さらには非臨床・臨床試験の評価など様々な要素との関連付けを合理的に勘案する必要がある。

品質確保に製造方法が果たす役割も、こうした様々な要素との相互補完関係の中で考えるべきものであることはいうまでもない。他の要素との相互補完関係を考えることなく、ただ、製造方法を詳しく記述してみても、合理的な品質確保のための方策、評価、そして実践ができるという訳ではない。

GMPは、規格を中心とする製品レベル及び製造工程での必要な要素を組み合わせ、遵守することで確保すべき品質の範囲内にあることが保証さ

れた製品を恒常的に生産・供給するための手段である。

次に、問題の切り口を変え、「開発時、承認審査時、製造販売後という医薬品のライフサイクルの主要段階における品質確保へのアプローチや製造方法問題のとらえ方」について、誰が主役を演ずるべきかも含めて、考察する。

- 製品開発及び製品の品質確保を最も合理的・効果的に行うために開発段階でどのような考え方、アプローチで品質確保方策や製造方法を設定していけばよいかは主に企業の課題であるが、その中で承認のための評価に関係する重要事項や背景データについては、よく吟味された資料整備が必要である。とくにCTD第2部(QOS)には、第3部の品質確保に関わる事項のエッセンスを資料として整備し、品質確保に関して自社が選択した考え方及びアプローチの科学的根拠や妥当性を要領よく説明する必要がある。
 - 承認申請・審査段階では、有効性・安全性との関係において承認条件として確保すべき品質の範囲を①製品の品質特性面、②製造方法面、③製品面と製法面の相互補完関係から、いかに合理的、効果的に定めていくかが課題である。この段階では、適切な資料提供と評価に関する企業側と審査側の共通認識と理解が必要であり、これは双方の課題となる。将来、この共通の課題に関する適切なICHガイドラインが作成されることは望ましいと考えられる。
 - 製造販売後では、承認条件として確保すべきとされた品質(特性)の製品を恒常的に生産するための製造現場における製造管理及び品質管理の基準の設定と確実な施行が中心課題である。これは主に企業側の課題である。この場合の製法変更は、コンパラビリティ問題又はGMPの変更管理問題である。
- 以上を、図にまとめたのが図4である。
- 開発段階でのデータが、CTDフォーマットにそって申請されてくるが、前述のように、承認事

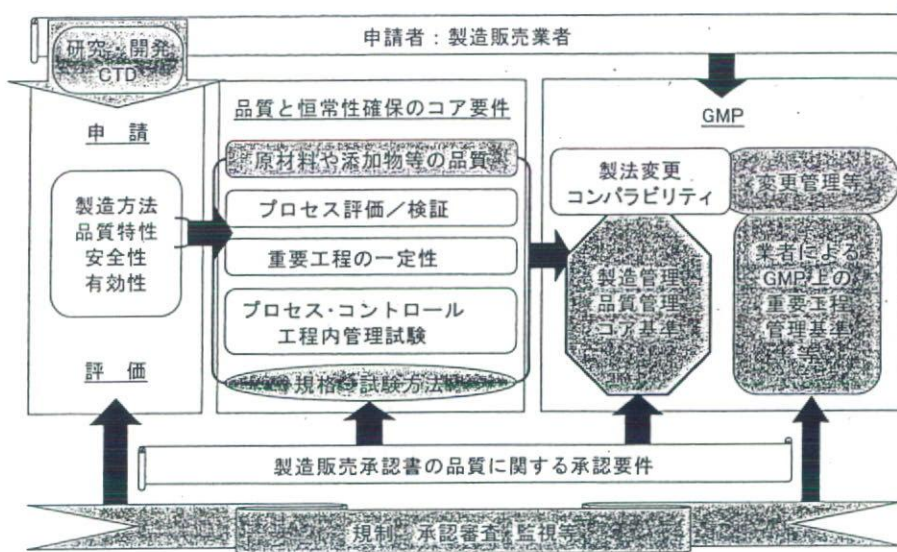


図4 開発時、承認審査時、製造販売後の各段階における品質確保や製造方法問題の要素と規制側及び業者の関与

項としての品質と恒常性確保要件とは、あくまで評価された製品の安全性・有効性を品質レベルで継続的に保証することを目的とした品質特性と製造方法のエッセンスで構成されるべきという視点、あるいはコンセプトを持つことがきわめて重要であると考えられる。

この要件の中に、製品の品質特性のエッセンスの反映という面では規格及び試験方法がある。製造方法面では、ケースにもよるが、含まれる可能性のある要素として、原材料や添加剤の品質・安全性の確保問題、プロセス評価/検証、重要工程の一定性、プロセスコントロール、工程内管理試験などがある。

ここで述べた品質確保のコア基準とは、あくまで安全性、有効性を保証するための品質確保との視点から見て最小限必要な要素のエッセンスであり、これらをいかに合理的に選択し、組み合わせ、きちんと承認申請書に盛り込み、その妥当性を説明するかが申請者の腕の見せ所であり、い

かに適正に評価して合理的な承認要件とするのがレビューアの腕の見せ所である。

この承認要件は当然のことながら GMP にも直結し、必然的に GMP 上で絶対守るべき製造管理、品質管理のコア基準となる。これは必ずクリアする必要がある、そうしなければ承認事項の逸脱になる。業者としてはこのコア基準、すなわち承認事項からの逸脱がないように、さらに独自に GMP 上の重要工程や管理基準等を設定することになるが、いかに合理的に変更管理等を行っていくかは、製造業者としての腕の見せ所となる。

なお、コア基準として承認事項となった製法の変更は、一変の対象であり、コンパラビリティ試験により評価される必要がある。一方、コア基準以外、すなわち、承認事項以外で業者が自主的に定めた製造管理及び品質管理の基準の変更は、変更管理の対象となる。

(早川堯夫)

第2節 糖鎖構造解析

表1は平成12年から18年に、医薬品一般名称(JAN)に届け出のあった遺伝子組換え医薬品をまとめたものである¹⁾。この中で、太字で示した品目が糖タンパク質である²⁾。半数以上が糖タンパ

ク質性医薬品であることがわかる。糖タンパク質性医薬品は、同一ポリペプチド鎖に様々な糖鎖が結合した複数の分子からなる不均一な集合体で、その不均一性の変化は、活性、体内動態、安定性、

表1 平成12-18年度 JANに届出のあった遺伝子組換え医薬品

一般名称	分類
アガルシダーゼ アルファ(遺伝子組換え)	アルファガラクトシダーゼA
アガルシダーゼ ベータ(遺伝子組換え)	アルファガラクトシダーゼA
アダリムマブ(遺伝子組換え)	ヒト抗体
アブシキシマブ(遺伝子組換え)	キメラ抗体
アルグルコシダーゼ アルファ(遺伝子組換え)	酸性 α -グルコシダーゼ
アンセスチム(遺伝子組換え)	幹細胞因子
イブリツモマブ チウキセタン(遺伝子組換え)	マウス抗体
インスリン アスパルト(遺伝子組換え)	インスリンアナログ
インスリン グラルギン(遺伝子組換え)	インスリンアナログ
インスリン グルリジン(遺伝子組換え)	インスリンアナログ
インスリン デテムル(遺伝子組換え)	インスリンアナログ
インターフェロン ベータ-1a(遺伝子組換え)	インターフェロン ベータ
インターフェロン ベータ-1b(遺伝子組換え)	インターフェロン ベータアナログ
エタネルセプト(遺伝子組換え)	TNF α 受容体およびIgGからなる融合タンパク質
オマリズマブ(遺伝子組換え)	ヒト化抗体
ゲムツズマブ オゾガマイシン(遺伝子組換え)	ヒト化抗体
サルグラモステム(遺伝子組換え)	GM-CSFアナログ
セツキシマブ(遺伝子組換え)	キメラ抗体
ダルベポエチン(遺伝子組換え)	エリスロポエチンアナログ
トシリズマブ(遺伝子組換え)	ヒト化抗体
トロンボモデュリン アルファ(遺伝子組換え)	トロンボモジュリン
バリビズマブ(遺伝子組換え)	ヒト化抗体
ペバシズマブ(遺伝子組換え)	ヒト化抗体
ペグインターフェロン アルファ-2a(遺伝子組換え)	修飾インターフェロン アルファ
ペグインターフェロン アルファ-2b(遺伝子組換え)	修飾インターフェロン アルファ
ペグビソマンツ(遺伝子組換え)	修飾成長ホルモンアナログ
ラスブリカーゼ(遺伝子組換え)	尿酸オキシダーゼ
ラニビズマブ(遺伝子組換え)	ヒト化抗体
ラロニダーゼ(遺伝子組換え)	α -L-イズロニダーゼ
リラグルチド(遺伝子組換え)	グルカゴン様ペプチドアナログ

太字：糖タンパク質

溶解性、および安全性に直接影響を与えることが多くの研究により明らかにされている³⁾。しかし糖鎖付加は、人為的に制御することが困難である上、製造方法に依存して変動することから、糖タンパク質性医薬品開発において、糖鎖部分の構造特性解析および特性に基づいた規格および試験法を設定することは重要である⁴⁾。本節では、糖タンパク質性医薬品の糖鎖構造特性解析法と糖鎖試験法について概説する。

1. 糖鎖結合部位と糖鎖構造⁵⁾⁻⁷⁾

1.1 糖鎖結合部位

糖タンパク質に結合している糖鎖は、大きく *N* 結合型糖鎖と *O* 結合型糖鎖に分類される。*N* 結合型糖鎖は、Asn-Xaa-Ser/Thr (Xaa は Pro 以外のアミノ酸) の配列中の Asn に結合している。この配列があっても、結合していない場合や、部分的にしか結合していない場合がある。*O* 結合型糖鎖は、主に Ser や Thr に結合している。*O* 結合型糖鎖の中でバイオ医薬品に多いムチン型糖鎖は、Ser/Thr-Xaa-Xaa-Pro 配列の Ser/Thr に見られることが多いといわれている。

1.2 *N* 結合型糖鎖の構造

N 結合型糖鎖はマンノース (Man) 3 分子および *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) 2 分子からなるトリマンノシルコアを共通構造とし、側鎖に Man, ガラクトース (Gal), GlcNAc およびシアル酸などが結合している。Man の割合に応じて、高マンノース型、複合型、および混成型糖鎖に分けられる (図 1)。

高マンノース型は Man が 5~9 個結合した糖鎖で、この糖鎖を持つ代表的な糖タンパク質にヒト組織プラスミノゲン活性化因子 (tPA) がある。

高マンノース型糖鎖は tPA の血中半減期に深く関わっている⁸⁾。多くの糖タンパク質性医薬品にみられる糖鎖は複合型糖鎖である。複合型糖鎖は側鎖の数で 2, 3, および 4 本鎖に分けられる。さらに非還元末端 Gal へのシアル酸付加, 還元末端 GlcNAc へのフコース (Fuc) の付加, トリマンノシルコアへのパイセクティング GlcNAc 付加などが見られ、構造は多岐に渡る。IgG に結合している主な糖鎖はシアル酸が結合していない複合型 2 本鎖糖鎖で、還元末端 GlcNAc への Fuc の付加は IgG1 の ADCC 活性に大きく影響する (本章第 4 節参照)⁹⁾。エリスロポエチンには主にシアル酸が 4 分子結合した 4 本鎖糖鎖が結合している。シアル酸の結合数はエリスロポエチンの活性と相関がある¹⁰⁾⁻¹⁶⁾。

1.3 *O* 結合型糖鎖

O 結合型糖鎖はいくつかのタイプに分類されるが、糖タンパク質性医薬品に多く見られるのはムチン型糖鎖である (図 1)。代表的な糖タンパク質に絨毛性性腺刺激ホルモン (hCG), トロンボモジュリン, およびエリスロポエチンなどがある。トロンボモジュリンやウロキナーゼのようにグルコースやフコースなどの単糖が直接結合している場合もある^{17), 18)}。

グリコサミノグリカンも *O* 結合型糖鎖の 1 つである。ヘパリンはウロン酸 (D-グルクロン酸または L-イズロン酸) と D-グルコサミンで構成される 2 糖単位が数十回繰り返した直鎖状の硫酸化グリコサミノグリカンである。ヘパリンを化学的あるいは酵素的に質量数千に分解した低質量ヘパリンも医薬品として用いられている。また、ヒアルロン酸は、GlcNAc と D-グルクロン酸の 2 糖単位からなる質量 50~300 万のグリコサミノグリカンである。