

品の品質を決める要因の一つである。遺伝子組換え高等植物を用いた有効成分の生産において、この原則を実行するための明確な方策を提示し、流れ図を用いて図示すること。

#### Good production practice

マスター・トランスジェニック・バンクとワーキング・トランスジェニック・バンクは通常、GMP環境下で樹立し、維持されるべきである。

有効成分の各バッチの製造工程とは、ワーキング・トランスジェニック・バンクの一部を取り出したところから、バッチの試験および出荷までとすること。

トランスジェニック植物を用いた製造工程は二つの異なるフェーズに分けられる。

製造の第一フェーズは、トランスジェニック植物を用いる生産技術に特異的であり、栽培、収穫、収穫物の一次加工（例えば、スクリーニング、洗浄、選別、膨潤、輸送、貯蔵）がこれに含まれる。このフェーズの要素に従来のGMPの原理を適用するのが現実的でない場合、適切な品質システムを開発して実施すること。

品質システムの記載に用いられる項目には、少なくとも、人材（適格性とトレーニングを含む）、トレーサビリティを含む記録作成、監査と視察の手はず、そのシステムがいずれかの公的機関で承認されているかどうかの情報を含むこと。システムの開発においては、HMPCの“植物由来出発原料の Good Agricultural and Collection Practice (GACP) に関するガイドライン”に書かれている基本原理が出发点として用いられるであろう。ただし、GACPガイドラインは、別の用途での植物の利用を目的としたものであるため、その順守の確認のみではトランスジェニック植物を用いた生産の

管理が適切だと見なされない。

すなわち、GMPあるいは決定された品質システムのいずれに準じて作業がなされる場合でも、製造工程の初期のステップが適切な工程内管理の適用によって十分に管理されると共に、GMP条件下での次の工程に適した十分に特性解析された出発原料が供給され、さらに、工程が十分に記録される必要がある。査察の際には、操作手順と記録を閲覧できるようにしておくこと。

一次加工の下流（製造の第2フェーズ）における有効成分の製造操作は通常、GMPに従って実施される。製品の分離、精製、製剤化などを含む第2フェーズは、全てのバイオテクノロジー応用医薬品に共通であり、一般的な要件は該当するCHMPやGMPガイドラインに記載されている。

#### 4.2.2 製造の第1フェーズ

##### 製造場所の記載

- ・ 明確な境界線を設けた地理的な位置
- ・ 生育支持体（典型的には土、水溶液、水性懸濁液）の品質と性質、水の供給、その他の原料（肥料や殺虫剤を含む）を規定し、適宜、規格および試験方法を設定すること。
- ・ 季節性や通常起こり得る変化を含め、主な気象条件について記載すること。その場所での最も極端な条件についても言及すること。
- ・ 栽培場所の監視
- ・ 地域の植物相および動物相
- ・ 周辺地域での他の遺伝子改変植物の栽培
- ・ 製造場所での作業に関する品質管理システム

##### 栽培方法

- ・ 繁殖の手順と技術。栽培方法に応じて、製

造工程での遺伝的安定性の資料を参照しながら、各段階での世代数を明らかにすること。

- ・ 目的外の植物や花粉などの外来の遺伝的物質の侵入を検出し、除去するための方法
- ・ 害虫を検出し、除去する方法
- ・ 植物の健康状態をモニタリングする方法、および病害への対策
- ・ 生産の一定性に関する工程内モニタリング。以下の例のように、栽培に関する重要な指標を決め、その指標が正当であることを示す：
  - ・ 季節性や近隣の植物相の性質を含む環境条件を考慮した栽培技術および場所
  - ・ 土壌の性質（放射活性がある可能性を含む）
  - ・ 植物ホルモンおよび肥料の使用
  - ・ 化学的あるいは生物学的な試薬を用いた殺虫剤
  - ・ 交配による遺伝型の多様化の可能性

#### 収穫および収穫後の初期加工

- ・ 収穫開始の基準
- ・ げっ歯類、鳥、死骸の混入を防ぐ技術を含む収穫方法
- ・ 輸送や貯蔵の方法を含む収穫直後の産物の取り扱い方法とその妥当性、および、施される機械的、物理的、化学的、あるいは生物学的な処理
- ・ 分離された一次加工品の貯蔵条件と期間

収穫物、有効成分、最終製品のバッチの定義を明確にし、各バッチについて、ワーキング・トランスジェニック・バンクまで遡ることのできるトレーサビリティの確保について記載すること。収穫物あるいは他の中間体をプールする計画を明確にし、適宜、規格および試験方法を設定すること。

#### 4.2.3 製造の第2フェーズ（下流加工）

一般のバイオテクノロジー応用医薬品の場合と同様に、製品の精製に用いられる方法とその工程内管理について規格および試験方法を含めて詳細に記載し、その正当性を検証すること。植物栽培に固有の特殊性を考慮し、工程の頑健性を示すことに特に注意を払うこと。

植物や製造工程に由来する不純物や混入汚染物質となり得るもの（例えば、宿主細胞由来タンパク質、DNA、植物代謝産物、除草剤、肥料、カビ毒）について評価すること。目的物質と類似した宿主由来タンパク質、目的物質と共に精製されてくる汚染物質、過敏反応など安全性上の懸念となる可能性のある全ての要素について、記録を取るよう留意すること。

不純物や汚染物質に関する精製工程の除去能力について示し、精製の各段階での不純物除去率と全体での除去率を明らかにすること。必要であれば、不純物/混入汚染物質の濃度を通常の製造工程で予想されるよりも高く（スパイク）して、その除去工程の頑健性を示すこと。さらに、現実的な条件と最悪の条件を想定して、投与量あたりの不純物/混入汚染物質の残存量の定量的評価を行うこと。

### 4.3 有効成分の品質管理

#### 4.3.1 特性解析

トランスジェニック植物由来の有効成分の特性解析は、関連するガイドライン（特に、規格および試験方法に関するICH Q6Bガイドライン）、薬局方、その他の要件を考慮して、適切な方法により実施すること。可能かつ妥当であれば、特性解析において、有効成分と天然に存在するカウンターパートとの比較も行うこと。見出された違いの影響について注意深く考察し、安全性と有効性の観点からよく議論すること。

物理的・化学的性質、生物学的性質、免疫化学的性質、純度、不純物を含む有効成分の詳細な品質プロファイルを、適切な分析技術を用いて明らかにすること。翻訳後修飾等により構造上の不均一性がある場合は、不均一性のパターンを明らかにすること。さらに、バッチ間での一定性を確保するための適切な工程管理と規格および試験方法を確立する基礎として、栽培、収穫、収穫後の加工、貯蔵が有効成分の多様性のパターンに与える影響を適切に明らかにすること。

糖鎖付加を含む植物タンパク質の翻訳後修飾に関しては、定性的、定量的に、包括的な特性解析を行うこと。この分析には、全体の単糖組成の決定、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、グライコフォームの分布）を含むこと。特性解析では、糖鎖以外の翻訳後修飾（例えば、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。

植物を利用した生産システムでは、宿主由来タンパク質と共に二次代謝産物を含むことがあるため、それらを精製工程で除去する必要がある。

目的物質由来不純物や製造工程由来不純物の特性解析には、適切な方法を用いる必要がある。宿主植物由来の不純物としては、(i)導入遺伝子以外から発現された植物タンパク質（例え

ばレクチン）、(ii)プロテアーゼ、(iii)植物 DNA、(iv)宿主植物から分泌されるアルカロイドや配糖体のような植物二次代謝産物、を考慮すること。製造工程由来不純物として、(i)生産や精製に用いられた材料（土、肥料、除草剤、溶媒、カラムから漏出したクロマトグラフィー担体など）、(ii)生産および精製の段階で外部から混入する可能性のあるエンドトキシン、アフラトキシン、その他のマイコトキシン、毒性金属などの化学的、生物化学的、微生物学的、生物学的な物質を考慮すること。

#### 4.3.2 規格及び試験方法

トランスジェニック植物を用いた生産に特有の事情を考慮した上で、有効成分を生産するそれぞれのバッチの日常的な管理及びバッチ間の一定性確保を目的とした全体の方策には、出発原料、試薬、栽培と加工の際に使用される材料の管理、管理基準の順守、適切な工程内管理の適用が含まれることを、承認申請する者は認識すること。

ICH Q6B “生物薬品（バイオテクノロジー応用医薬品／生物起源由来医薬品）の規格および試験方法の設定”に記載されているように、規格及び試験方法に含まれる試験項目を選定する必要がある。規格及び試験方法に設定される試験項目は、個々の製品により異なる。規格値／適否の判定基準の適合範囲の設定根拠を明らかにすること。それぞれの規格値／適否の判定基準は、特性解析データ、非臨床試験や臨床試験に用いたロットから得られたデータ、製造の一定性を示すために用いたロットから得られたデータ、及び安定性試験のデータ、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、その根拠を示す必要がある。

#### 4.4 感染性物質による汚染の防止

##### 4.4.1 非ウイルス性感染性物質

マイコプラズマ、細菌、真菌類が、生物学的医薬品の製造に際して管理および試験されるべき一般的な細胞体である。しかし、植物由来の原料が含まれる場合は、材料の汚染の原因となり得る単細胞生物あるいは後生動物類が収穫時や加工段階の植物組織に付着している可能性を管理することが必要であろう。

無菌的に取り扱うべき材料や製品において、滅菌工程は、用いられる材料に起こりうる最悪の汚染レベルを想定して検証すること。

#### 4.4.2 ウイルスおよびウイロイド性感染性物質

自然界には様々な植物ウイルスおよびウイロイドが存在する。それらは、動物ウイルスと同様、一般的に、植物と組織に特異的である。ヒトは長年にわたって、主として経口あるいは局所経路、場合によっては意図せずに非経口的に接種することにより、日常的に植物の組織や液性成分に接してきているが、植物ウイルスおよびウイロイドがヒトや他の脊椎動物に対して病原性を持つという証拠はこれまでにない。さらに、植物ウイルスの動物細胞での増殖、あるいは、動物ウイルスの植物細胞での増殖の試みは、いずれも成功していない。

より懸念すべきであるのは、工程で用いられる材料や機器類が、昆虫、鳥、動物の排泄物、死骸やその一部、有機肥料の残り、あるいは生産に関わるヒトから排出されたものにより意図されずに汚染されること、すなわち材料がヒトに対して病原性を持つウイルスにより汚染されることである。例えば、げっ歯類の排泄物に含まれることのある Hanta ウイルスは、世界中でみられ、ヒトに対する多くの致死的な病気の原因となりうる。しかし、混入しうるウイルスの範囲は相当あり、マウスの minute virus (MVM)、トリインフルエンザウイルス、A 型肝炎ウイルス (HAV) のような排泄物に由

来する他のウイルスも含まれる。全体として、出発原料あるいは工程中間体がウイルス等で汚染される確率は、製造が行われた環境を含む製造手法の特性と程度、用いられた封じ込め方法、適切な品質と工程の管理システム、そして作業従事者に依存する。

試薬、クロマトグラフィー用担体、成長促進剤、増殖用培地のような生物由来原料を工程で意図的に用いることにより起こりうるウイルス汚染は、十分に確立された方法によって管理すること。

植物の病気を正しくモニターする対策を講じること。病気により、植物ウイルスが収穫物に多量に混入するのみならず、生産物の発現や構造にも影響が生じることがある。モニター法を考える場合、感染による植物の病気が目に見えて分からない場合があることを考慮すること。

場合によっては、混入したウイルスやウイロイドが製造工程中で増幅、消去、あるいは濃縮されることがある。しかし、懸念される動物ウイルスにより出発原料や製造工程の汚染が起こった場合、動物細胞のバイオリアクターでのようには増幅されないことを認識しておくこと。

上記の事項をそれぞれ考慮して、申請者は感染性ウイルス物質による有効成分の汚染の可能性についてリスク分析を示す必要がある。この分析は、可能な限り定量的に行われる必要があり、その分析に基づいて、申請者は、医薬品のバッチごとのウイルス安全性を担保する各段階での統合的な方策を述べること。

有用な方策は、以下のいくつか、あるいは以下の全ての手段を含む

- ・ 出発原料、原料、試薬、添加物の管理および試験
- ・ 外来の物質の混入を防ぐ目的での農作業段階（栽培、収穫、収穫後の加工）での囲い（封じ込め）
- ・ 未加工／未精製バルクあるいは加工されたバルクなどの製造工程の重要な段階での *in vitro* および *in vivo* の感染性物質否定試験
- ・ 検証されたウイルス／ウイロイドの不活化／除去工程

#### 4.4.3 伝達性海綿状脳症（TSE）関連

製造に用いられるものの中で、動物 TSE 伝播のリスク最小化に関する EU ガイドラインの適用対象に入るものは全て明らかにし、ガイドラインの要求事項を満たしていることを示すこと。

#### D. 考察

バイオ医薬品の品質・安全性確保は、原薬・製剤の規格および試験方法の設定による製品の品質管理と、製造工程の管理が両輪となって達成される。微生物や動物細胞を用いて製造される従来の組換えタンパク質性医薬品では、バンク化された細胞が出発原料（医薬品製造基材）であり、ウイルス安全性試験を含め十分な特性解析と品質管理が行われた出発原料から目的タンパク質の製造が開始される（Fig. 1）。これに対してトランスジェニック植物により生産される組換えタンパク質性医薬品では、トランスジェニック・バンクを元に、植物を栽培、収穫して、目的タンパク質発現組織の採取が行われ、それを元に出発原料の調製が行われるため、トランスジェニック・バンクの管理のみでは、出発原料の適格性を担保することができない。

したがって、トランスジェニック植物を用いて生産される組換えタンパク質性医薬品の品

質の一定性確保のためには、適切なトランスジェニック植物株の樹立とバンクの確立、及びトランスジェニック・バンクから出発原料調製までの工程管理手法の確立、の双方が重要である。また、製造方法確立の検討および実生産の段階で、生産に用いる植物の遺伝的な均一性を確保し、生産期間を通じた目的タンパク質発現の安定性を確認することに十分配慮する必要があると考えられる。バンクの作製が困難な場合は、適格性の示された代替手法を確立することが必要であろう。植物の特性は種ごとに非常に多様であるので、宿主植物の特性に応じてケースバイケースの対応が求められるが、EMEA ガイドラインを参考に一般原則と考えられることを以下に考察する。

#### D.1. トランスジェニック植物株の樹立とバンクの確立

##### D.1.1 トランスジェニック植物株の選別・樹立

遺伝子導入により作出された最初の形質転換体は通常、生産用の形質転換体を得るために何世代かにわたって栽培される。生産に適した形質転換体を選別するための指標を明確にし、その妥当性を説明する必要がある。その際には、目的タンパク質の発現、導入遺伝子の状態、植物体としての特性などを考慮する必要がある。また、選別の工程を経て得られたマスター・トランスジェニック・バンク作製に用いられる形質転換体、すなわち、医薬品生産に用いられる植物株については、特に詳細に遺伝型と表現型を解析する必要がある。

Table 3 に示したように EMEA ガイドラインでは、マスター・トランスジェニック・バンクを作製する植物体については、目的遺伝子の解析のみならず、目的遺伝子以外への影響（ジーンサイレンシングや他のタンパク質の過剰発現）についても解析することが推奨されている。動物細胞を用いた発現系では、導入遺伝子のコピー

一部の解析や複数の制限酵素で切断したゲノムDNAに対するサザンブロット等は通常行われるが、挿入部位の詳しい解析や、その他の遺伝子・タンパク質の発現への影響の解析までは実施されないことが多いと思われる。導入遺伝子に起因するジーンサイレンシング活性や多形質発現効果は、生産用作物に影響し、結果として有効成分の品質や安全性に影響する可能性があることから、トランスジェニック植物を用いた生産系では、このように詳細な検討を実施することが望まれる。

#### D.1.2. トランスジェニック・バンクの作製と評価

トランスジェニック・バンクは、培養細胞の場合と同様に二段階方式をとり、マスター・トランスジェニック・バンクとワーキング・トランスジェニック・バンクから構成され、種子の保存が可能な植物では種子を用いたバンクが作製されることが妥当と考えられる。前述のように、マスター・トランスジェニック・バンク作製に用いられる植物株については、十分な特性解析が必要である。EMEAガイドラインでは記載が限られているが、トランスジェニック・バンク（種子）そのものの試験も工程管理に必要な要素であると思われる（Fig. 2）。

##### D.1.2.1. トランスジェニック・バンクの特性解析試験

由来する種の確認や、目的タンパク質を発現する植物体が生産されることの確認等が必要である。例えば種子の重量や比重など、植物体の生育に関連し、かつ測定可能な要素があれば、その項目に関して規格値を設定することがバンクの均質化に有用である可能性が考えられる。

##### D.1.2.2. トランスジェニック・バンクの純度試験

他の植物の種子あるいは非組換え体の種子の混入がないことや、微生物などの汚染がないことを確認する。

##### D.1.2.3. トランスジェニック・バンクの安定性試験

定められた条件下での保存期間中に目的とするトランスジェニック植物を作出する能力を有していることを確認し、貯法と有効期限を設定する。

##### D.1.2.4. ウイルス安全性試験

ヒトあるいは動物細胞のバンクで求められる内在性ウイルス安全性試験については、植物ウイルスがヒトに感染する危険はないと考えられることから、不要である。薬事法では、『この法律で「生物由来製品」とは、人その他の生物（植物を除く。）に由来するものを原料又は材料として製造（小分けを含む。以下同じ。）をされる医薬品、医薬部外品、化粧品又は医療機器のうち、保健衛生上特別の注意を要するものとして、厚生労働大臣が薬事・食品衛生審議会の意見を聴いて指定するものをいう。』とされており、植物由来製品ではヒトや動物由来の試料を原料または材料とする場合に問題となる感染性因子混入の危険がないと考えて差し支えないと一般的に解釈されていることが、ここからも読み取れる。しかし、EMEAガイドラインで述べられているように、植物の栽培環境によっては、動物やヒトから感染性物質が混入する可能性が否定できない場合もあり得る。そのような場合には、出発原料の段階で、ウイルス安全性試験の実施を考慮すべきであろう。

##### D.1.3. 遺伝子的安定性の評価

生産期間を通じた遺伝的安定性を検証するためには、マスター・トランスジェニック・バンク作製に用いられる植物体と、規定された生産用の栽培期間を経た世代について、目的タン

バク質の発現を比較すると共に、導入された遺伝子構成体の解析を適切に実施する。世代間の発現の安定性のみならず、必要に応じて、同一世代内での目的タンパク質発現の安定性も評価することが望ましい。

#### D.2. ワーキング・トランスジェニック・バンクから出発原料調製までの管理

EMEA ガイドラインで製造の第 1 フェーズと位置づけられているワーキング・トランスジェニック・バンクから出発原料調製までの段階は、栽培の形態や、目的タンパク質が発現する部位が発現系ごとに大きく異なることから、共通したガイダンスを提示することが難しく、個々の製造業者により用いられた方法の妥当性の説明が求められるところである。工程管理手法を確立する上では、栽培条件の変動があっても目的物質の発現量や特性に影響が生じにくい優れた生産用植物株を樹立した上で、各種の栽培条件が生産用植物株の生育や目的物質の発現量あるいは翻訳後修飾等に与える影響を明らかにすることが重要であろう。圃場栽培であっても、施設内での作業と同様に、作業手順を定め、作業内容や測定値を記録し保管すべきである。

生産用植物株の遺伝的な均一性が確保されている場合においても、植物の個体ごとに目的物質の発現量や共存するタンパク質に差異が生じる可能性が考えられる。したがって、可能であれば、採取された組織・浸出液について、原材料としての適格性を評価した上で、出発原料への加工に進むことが望ましいと考えられる。その際には、出発材料に関して規格を設定し、管理することも考慮すべきであろう。

#### D.3. その他

トランスジェニック生物を用いて生産された組換えタンパク性医薬品としては、トランス

ジェニック動物（ヤギ）で生産されたアンチトロピン（ATryn®）が 2006 年に欧州で承認されたことに続いて、2009 年には米国でも承認された。EMEA から公表されている資料<sup>11)</sup>によると、ATryn®の生産系では、マスター・トランスジェニック・バンクは、適格性の確認された F0 および F1 の雄の精液と、適格性の確認された P0 および P1 の雌から構成され、ワーキング・トランスジェニック・バンクは、適格性の確認された雄と雌、および適格性の確認された雄の精液から構成されている。詳細は明らかでないが、各ヤギのジェノタイプの確認と群れの遺伝的な均一性の向上に相当な努力がなされた、とされている。また、原材料であるトランスジェニック・ヤギの乳汁は、目的物質の産生量と微生物スクリーニング等により適格性の確認された雌ヤギから採取されていること、特定のタンパク質の量、乳糖、総タンパク質量、脂質量のばらつきを低減して原材料の一定性を向上させるために乳汁採集方法を改善したことが記載されている。

トランスジェニック植物を用いた組換えタンパク質生産系では、トランスジェニック動物を用いる場合と比較して、感染性物質混入のリスク低減のための対策および評価に要する作業が大幅に少ないと想定される。また、種子植物の場合は、種子によるバンクの作製、維持が可能であることから、生産スケールの増減にも対応しやすく、トランスジェニック動物と比較して、維持管理に関しても利点があると思われる。感染性物質の対策や維持管理の点でより困難と思われるトランスジェニック動物の方が先行している理由としては、発現量の問題が要因であろうと思われる。現在では、高投与量を必要とする抗体医薬品の生産にトランスジェニック植物を応用するという試みが行われていることから、技術改良は進んでいると思われる。

最初のバイオ医薬品である組換えインスリンが上市されてから四半世紀を経た現在、トランスジェニック動物で生産された製品やバイオ後続品が欧米で承認されるなど、バイオ医薬品の歴史の中でマイルストーンとなる出来事があり、バイオ医薬品をめぐる環境は大きな転換期を迎えている。新世代バイオ医薬品の一角をなすものとして、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性医薬品についても、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。

#### E. 結論

- (1) トランスジェニック植物を用いた組換えタンパク質性医薬品の開発では、インターフェロンやインスリンで臨床試験が進められており、臨床での使用実績のあるタンパク質を有効成分とする医薬品の新たな生産宿主として、トランスジェニック植物の利用が進んでいる。
- (2) トランスジェニック植物を用いた組換えタンパク質性医薬品の製造においては、品質の一定性確保のため、生産期間を通じて適格な出発原料が供給されるよう、栽培条件の変動があっても目的物質の発現量や特性に影響が生じにくい優れた生産用植物株を樹立してトランスジェニック・バンクを作製すると共に、栽培・収穫・初期加工からなる製造の第1フェーズの管理手法を確立することが重要である。

#### 参考文献

- 1) Spok A, Twyman RM, Fischer R, Ma JK, Sparrow PA. Evolution of a regulatory framework for pharmaceuticals derived from genetically modified plants. *Trends in biotechnology*. 26(9), 506-17, 2008
- 2) EMEA. Guideline on the quality of biological active substances produced by stable transgene expression in higher plants (EMEA/CHMP/BWP/48316/2006). [cited; Available from: <http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/bwp/4831606enfin.pdf>
- 3) CaroRxTM. [cited; Available from: <http://www.planetbiotechnology.com/products.html>
- 4) Locteron®. [cited; Available from: <http://www.biolex.com/locteron.htm>
- 5) Insulin (SBS-1000). [cited; Available from: <http://micro.newswire.ca/release.cgi?rkey=1612036526&view=36078-0&Start=0>
- 6) prGCD. [cited; Available from: <http://www.protalix.com/glucocebrosidase.html>
- 7) Shaaltiel Y, Bartfeld D, Hashmueli S, Baum G, Brill-Almon E, Galili G, Dym O, Boldin-Adamsky SA, Silman I, Sussman JL, Futerman AH, Aviezer D. Production of glucocerebrosidase with terminal mannose glycans for enzyme replacement therapy of Gaucher's disease using a plant cell system. *Plant biotechnology journal*. 5(5), 579-90, 2007
- 8) FDA. Guidance for industry : Drugs, biologics, and medical devices derived from bioengineered plants for use in humans and animals. [cited; Available from: <http://www.fda.gov/cber/gdlns/bioplant.pdf>
- 9) Guideline on the quality of biological active substances produced by stable transgene expression in higher plants (DRAFT). [cited; Available from:



<http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/bwp/4831606en.pdf>

- 10) Overview of comments received on draft guideline on the quality of biological active substances produced by stable transgene expression in higher plants.

[cited; Available from:

<http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/bwp/12586208en.pdf>

- 11) Scientific discussion for ATryn. [cited; Available from:

<http://www.emea.europa.eu/humandocs/PDFs/EPAR/atryn/058706en6.pdf>

## 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) Takuo Suzuki, Norimasa Tamehiro, Yoji Sato, Tetsu Kobayashi, Akiko Ishii-Watabe, Youichi Shinozaki, Tomoko Nishimaki-Mogami, Toshihiro Hashimoto, Yoshinori Asakawa, Kazuhide Inoue, Yasuo Ohno, Teruhide Yamaguchi, and Toru Kawanishi: The novel compounds that activate farnesoid X receptor: the diversity of their effects on gene expression. *J. Pharmacol. Sci.* 107, 285-294 (2008)
- 2) 山口照英、石井明子 早期臨床開発段階でのバイオ医薬品の品質・安全性確保 臨床評価 2009 (印刷中)
- 3) 川崎ナナ、石井明子、荒戸照世、山口照英 抗体医薬品の構造及び品質特性解析 抗体医薬品製造の留意点～承認申請をふまえて～ サイエンス&テクノロジー社 2009 (印刷中)
- 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  
PHARMASTAGE 7, 1-6, 2008

### 2. 学会発表

- 1) 鈴木琢雄、石井明子、多田 稔、小林 哲、豊田淑江、川西 徹、山口照英：抗体医薬品およびFc ドメイン融合タンパク質医薬品のFc 受容体FcRnとの結合親和性比較 日本薬学会第129年会 2009年3月 京都
- 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 の特性指標の探索と機能解析 第8回日本再生医療学会総会 2009年3月 東京
- 3) 豊田淑江、石井明子、鈴木 浩子、李勤、田村悦臣、森田育男、山口照英：血管内皮前駆細胞である Early EPC と Outgrowth Endothelial Cell の特性解析 第81回日本生化学会大会 2008年12月 神戸
- 4) Takuo Suzuki, Akiko Ishii-Watabe, Tetsu Kobayashi, Toshie Kanayasu-Toyoda, Minoru Tada, Toru Kawanishi and Teruhide Yamaguchi : Affinity of therapeutic monoclonal antibodies and fusion proteins to neonatal fc receptor (FcRn) 日本薬物動態学会 第23回年会 2008年10月 熊本

## 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

Table1 トランスジェニック植物を用いて生産された結核タンパク質性医薬品の開発動向

結核タンパク質	適応症	生産方法	収穫後	臨床試験	投与方法
抗-Smads5抗体 (分画型pA3: Oarc9b <sup>TM</sup> )	がん	遺伝子タバコ	精製	Phase I	口内*
インターフェロン $\alpha$ アルファベータ (感染性制御: lacteron <sup>TM</sup> )	O型肝炎	遺伝子ウキウキ	精製	Phase II	皮下*
メリパゼ (Meripase <sup>®</sup> )	菌毒性肺炎症、肺炎	遺伝子トウモロコシ	精製	Phase I*	皮下
インスリン (INS-1000)	糖尿病	遺伝子ペニバチ種子	精製	Phase I / II	皮下
インターフェロン $\alpha$ アルファベータ (BLX-477)	Lacteronの有効成分	遺伝子ウキウキ	精製	Phase I	筋肉内**
抗-tuberculosis抗体 (DoseRx <sup>TM</sup> )	抗結核菌作用薬	遺伝子タバコ	精製	Phase I	局部
ラクトフェリン	ドラッグ	遺伝子トウモロコシ	精製	Phase I*	点眼
大腸菌 基天性腸管毒009 ワクチン	下痢	遺伝子トウモロコシ	未精製	Phase I	皮下
大腸菌 基天性腸管毒009 ワクチン	下痢	遺伝子ジャガイモ	未精製	Phase I	皮下
HEV抗原 ワクチン	O型肝炎	遺伝子ジャガイモ	未精製	Phase I	皮下
HEV抗原 ワクチン	O型肝炎	遺伝子レタス	未精製	Phase I	皮下
ノーフォークウイルスカプシド ワクチン	ノーフォークウイルス感染	遺伝子ジャガイモ	未精製	Phase I	皮下
狂犬病ウイルス ワクチン	狂犬病	オウレンウ(一遺伝子発現)	未精製	Phase I	皮下
sdFe (ワクチン)	赤ネジキルノ菌	タバコ(一遺伝子発現)	精製	Phase I*	皮下
グルコセラブランダーゼ (Gr900)	ゴース病	遺伝子ニンジン細胞	精製	Phase III	点眼療法

\* 開発企業の側面等により、開発が中止された可能性がある。 Spook A et al. Trends in Biotech 26, 505, 2008 をもとに作成  
 \*\*投与方法が明らかでないため、詳細な投与方法を記載した。

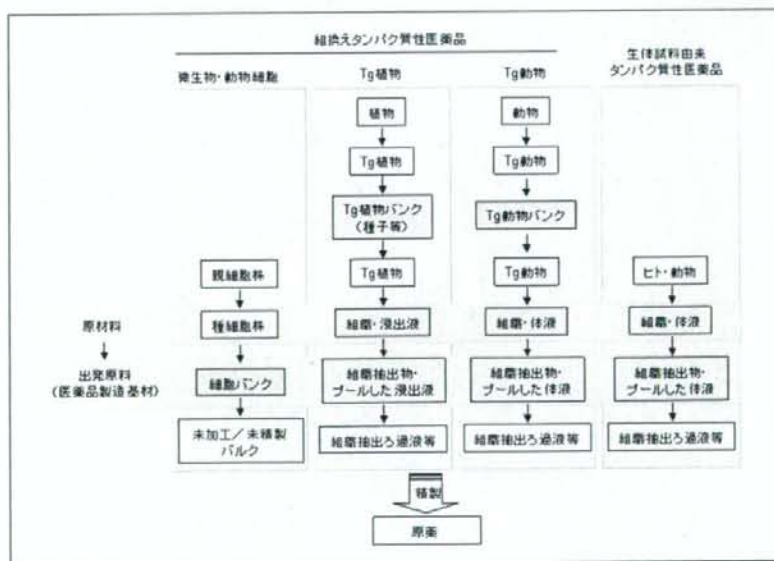


Fig.1. タンパク質性医薬品の原材料と出発原料

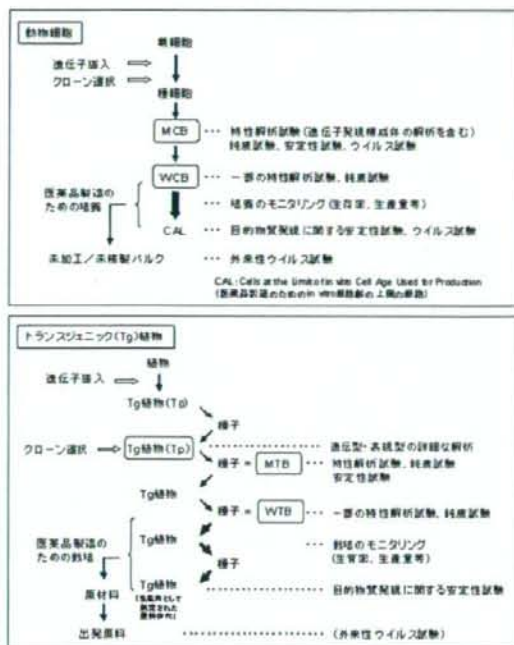


Fig.2 動物細胞あるいはトランスジェニック植物を用いた組換えタンパク質性医薬品の製造工程

抗体医薬品の品質・安全性確保のための規制動向

分担研究者 山口照英 国立医薬品食品衛生研究所

バイオテクノロジー応用医薬品のなかでもモノクローナル抗体医薬品の開発が急速に進展している。今後も同様の傾向が続くと予想され、2007年に抗体医薬品のヨーロッパ医薬品庁（EMA）では抗体医薬品の品質確保に関するガイドライン案を作成した。この中で、興味あるコンセプトとして抗体医薬品は共通の構造特性を持ち、製法から品質特性解析や規格試験法に関しても共通の基盤技術が適用できるとしている。このような基盤技術をプラットフォーム技術と呼び、開発や評価においてこのプラットフォーム技術を利用することにより、迅速な開発が可能としている。本報告書では、この抗体医薬品のプラットフォーム技術の有用性を調査し、さらに、このようなプラットフォーム技術を製法の確立や、品質特性解析、規格試験法の設定においてどのように適用すべきかについて明らかにした。

A.はじめに

21世紀に入り、バイオテクノロジー応用医薬品（バイオ医薬品）の中でも特にモノクローナル抗体を用いた抗体医薬品の開発が急速に進んでいる。これは、ハイブリドーマ作製技術やファージディスプレイシステムなどのモノクローナル抗体作成技術を基盤として、組換えDNA技術等を利用したヒト化抗体作製技術の進展が大きく寄与していると考えられる。国内で承認される多くのバイオ医薬品が抗体医薬品であり、海外先進国でも同様の状況である。これは、たとえばEMAのオーファンドラッグの指定を受けた製品における抗体医薬品のリストから今後の開発動向が推定することができる。このような開発動向の特徴として、従来のモノクローナル抗体のみならず化学修飾を行った抗体やアイソトープやトキシンとの融合製品もあり、さらには2価抗体など多様な抗体医薬品が開発されつつある。

開発が進められているモノクローナル抗体医薬品（抗体医薬品）に求められる要件について、欧米ではガイドライン等でその考え方が示されている。例えば、FDAでは1995年にモノクローナル抗体とDNA組換え医薬品の品質管理に関するガイドラインを発出している(1)。さらにこれを補完するものとして、1997年にモノクローナル抗体医薬品の考え方を示している(2)。一方、EMAも1994年に出したモノクローナル抗体医薬品に関するガイドラインの改訂を予定しており、2007年末にはモノクローナル抗体の品質管理に関するガイドライン案が出されている(3,4)。

残念ながらわが国ではモノクローナル抗体医薬品に関する指針等を出していないが、基本的にはICHバイオ医薬品のガイドラインに示されている指針に準じて評価を行うことが求められる(5-9)。しかし、モノクローナル抗体を主成分とする抗体医薬品は構造や生物活性な

どの品質特性に関して共通する特徴を有しており、抗体医薬品に求められる要件を明らかにしておくことは、開発の有用な参考となるばかりでなく、承認審査においても活用が可能であり、審査の迅速化にもつながると期待できる。本年度は、モノクローナル抗体を有効成分とする抗体医薬品の品質や安全性確保において求められる要件について調査研究を行った。

## B. 研究方法

欧米の抗体医薬品の品質・安全性に関するガイドライン等を調査研究の対象とした。

## C. 結果と考察

### 1. 抗体医薬品の構造的特徴

モノクローナル抗体は単一の抗体産生細胞が産生する抗体(免疫グロブリン)分子であり、特定の抗原に対する特異性を持つものと規定することができる。世界で承認されているモノクローナル抗体医薬品に加え、開発途中にある製品を含めると非常に膨大なものになるといわれている。これまで開発されてきた抗体医薬品は、IgG1、IgG2、IgG4のサブクラスがあり、かつ抗腫瘍効果を増強するために放射線標識やトキシンを結合させた抗体医薬品、Fab断片やPEG化修飾を行った製品など、いくつかの改変体製品も既に市場に出されている。

一方で、ヨーロッパ医薬品庁(EMEA)でオーファンドラッグの承認を受けた抗体医薬品は40品目近くに上り、詳細な特徴は不明ながら多様な製品が開発中であることが分かる。これらの製品すべてが医薬品になるとは考えられないが、開発動向を把握する上では有用な参考情報と思われる。今後、単にモノクローナル抗体のみを有効成分とするのではなく、有効性の更なる増強や、安全性確保などの観点から、

さまざまな改変を加えたり、さらには修飾したりする製品が開発されてくると考えられる。また2価抗体のように同時に2つのターゲット分子に結合する能力を有し、複数の機能を持つというこれまでにないコンセプトをもつ製品の開発も進められている。このような開発動向も視野に、抗体医薬品の品質・安全性確保の要件を考えてみたい。

抗体医薬品の品質・安全性を考える上での大きな特徴は、他のバイオ医薬品と異なり基本的に共通する骨格構造を持つ製品であるという点である。最新の開発中の製品ではこのようなコンセプトの適用が必ずしも適用しにくいものもあるが、基本的には培養工程や精製工程などの製造方法の確立、不純物の除去やウイルス安全性評価、さらにはそのバリデーションを含めて非常に共通した基盤技術が適用可能であるということを意味している。たとえば、製法開発において、既に承認を受けている類似した抗体医薬品や先行して開発している類似抗体医薬品がある場合に、共通する基盤技術を開発に利用することが考えられる。

### 2. 製造工程

#### 2.1. モノクローナル抗体産生細胞株の樹立

現在、殆どのモノクローナル抗体医薬品はキメラ抗体やヒト化抗体、あるいはヒトモノクローナル抗体としてヒトでの抗原性をできる限り低減化する方向で製品化されており、異種抗体を用いた製品の開発はほとんど行われていない。例外的に、マウス抗体等の開発も続けられているが、短期的な使用に限定されているようであり、そのような製品の開発では抗原性についての妥当性を示す必要があると考えられる。現在承認申請されてくる抗体医薬品は組換え

DNA 技術を用いてモノクローナル抗体産生細胞を作製し、この細胞を用いて製造を行う最新の科学技術が使われている。組換え DNA 技術を用いて製造されるモノクローナル抗体医薬品に関しては、組換え DNA 技術を用いて製造される医薬品のガイドライン、ICH Q5A、ICH Q5B、ICH Q5D ガイドライン(5,6,8)を参照して細胞の樹立、ウイルス安全性評価、導入遺伝子や製造にわたっての遺伝的安定性を評価することが求められるであろう。

多くのターゲットとする抗原への結合する超可変領域や可変領域を得るためにハイブリドーマ作製技術や関連する技術が用いられているが、場合によってはモノクローナル抗体の臨床開発初期段階にも、ハイブリドーマ技術等を用いて製造されたモノクローナル抗体(ヒト化あるいはヒト抗体を産生する先端技術が用いられている)を用いていることもある。このような場合、臨床開発の進展に伴って組換え DNA 技術を用いた製造へと変更が行われている。製法変更に当たっては後述する ICH Q5E ガイドライン(10)にしたがって旧製法で得られた製品との同等性・同一性評価が必要となる。

## 2.2. 抗体医薬品製造に用いられる組換え DNA 技術及び細胞バンクの樹立

抗体産生にも用いる発現システムについては、用いる遺伝子発現ベクターの構造や特性、さらに宿主細胞に関する情報を含めて明らかにしておくことが求められるであろう。

生産クローンを得るために用いる目的遺伝子を得るために細胞融合やウイルスによる形質転換、さらには遺伝子ライブラリーやファージディスプレイなどの特殊な技術を用いる場合には、このような目的遺伝子を得るための前処理工程について、目的遺伝子の由来やクロー

ニング法について理解可能な程度の情報を明らかにするとともに、製造期間にわたっての安定性についてもデータを示す必要がある。

## 2.3. モノクローナル抗体の製造

モノクローナル抗体原薬の製造工程(細胞培養や精製工程)の確立及びその恒常性を示すために、1) 製品の不均一性に関して恒常性のある製造が担保されていることや 2) 製品及び製造関連不純物(例えば宿主由来タンパク質、DNA、プロテイン A、細胞培養に用いる成長因子等)の十分な除去能を持つことなどを明らかにする必要がある。生産細胞基材の開発や培養技術の飛躍的な進展から、殆どのケースで無血清条件下での培養工程が採用されている。従って、製造の確立において問題となる工程由来不純物の多くが宿主由来タンパク質や DNA である。しかし、無血清培養であっても、細胞培養で用いる増殖因子や種々の添加剤についても、除去状況の評価や必要に応じて最終製品等での規格設定を考慮すべきであろう。

抗体医薬品の開発段階及び製造工程バリデーションを実施する際には、遺伝的安定性、培養工程及びハーベストの最適化(イールドや製品の品質など)について注意を払う必要がある。また、適切な工程管理を行い、必要に応じて重要工程の設定も考慮すべきであろう。

## 2.4. 抗体医薬品に共通する製造工程

最初に述べたように、モノクローナル抗体の構造、物理化学的特性については、長年の工業的に抗体産生及び製造工程の経験によって、非常に理解が進んでいる。すなわち、異なるモノクローナル抗体であっても、共通の精製工程等を適用できるというコンセプトが確立されて

きている。しかも、精製工程を試行錯誤の上に設計するのではなく予め最適な工程を設計可能であるとも考えられている。この抗体医薬品に共通して適用できるコンセプトについては EMEA のモノクローナル抗体に関するガイドラインではプラットフォーム工程と呼ばれている。

多くの抗体医薬品の共通する製法としては、図 1 に示すように、バルクハーベストを以降のカラム工程等に導入するためのろ過や限外濃縮、緩衝液の調整等を行い、ついでプロテイン A カラムによるアフィニティークロマトグラフィー工程を行っている。さらに、複数のイオン交換クロマトグラフィーや疎水性クロマトグラフィーなどのカラムクロマトグラフィー工程による精製を経て、ウイルス除去膜工程を行うことが良く行われている。さまざまなバリエーションがあり、必ずしも全てが同様の工程が採用されているわけではないが、欧米のモノクローナル抗体製品に関するガイドラインもこのような製法の共通性を前提に記載されている。

また、ウイルスクリアランス工程についてもプロテイン A クロマトグラフィー工程と溶出での酸性処理工程、ウイルス除去膜工程、さらには特定のカラムクロマトグラフィー工程などを評価対象とすることが広く行われている。しかし、このことはモノクローナル抗体製品の工業化に当たって必ずしも同一の精製工程が適用可能であることを意味しているわけではない。むしろ、製造業者はそれぞれ製品の特徴に応じて製造工程を最適化しておくことが求められる。

## 2.5. ウイルス安全性と伝達性海綿状脳症

ウイルス安全性に関しては、ICH Q5A ガイ

ドライン(5)に準じることが求められる。ICH Q5A ガイドラインでは、生産細胞のウイルス試験からバルクハーベストの試験のみならず、製造工程でのバリデーションについても記載されている。基本的には抗体医薬品においても他のバイオ応用医薬品と同様な要件が求められると考えられるが、モノクローナル抗体製品に共通する特性やそれにもとづく製造工程の高い類似性から、開発段階では、より効率的・合理的なアプローチが可能となるであろう。特に同一の宿主細胞を用いる場合などでは、セルバンク試験などでは共通の試験が適用できるであろうし、またウイルスバリデーションの設計に当たっては効率的な試験デザインが可能と考えられる。

ウイルスクリアランス工程として評価の対象となるプロテイン A クロマトグラフィー工程やウイルスろ過工程などは抗体濃度や緩衝液系などの設定は共通化が可能な場合が考えられる。また、ウイルスクリアランス工程ではクロマトグラフィー工程によるウイルス除去工程と溶出後の酸性処理時間のデザインなどを合理的に設定することが可能と思われ、また一度十分な評価を行っておくことにより除去工程と不活化工程を分けて評価することも可能になると思われる。承認申請におけるデータとしては製品ごとに評価を行うことが必要と考えられるが開発初期においては企業の経験等を参考にすることも可能であろう。

承認申請データとしては抗体医薬品ごとに十分なウイルスクリアランスのバリデーションを行うことが必要であるが、各カラムクロマトグラフィー工程のウイルスのキャリアオーバーやカラムのサニテーションなどは他の製品での経験やデータを利用することも可能と

考えられる。

一方、抗体医薬品は従来のバイオテクノロジー一応用医薬品と異なり、一般的に投与量が多いことも特徴であり、かつより臨床効果を高めるために大量投与を行うケースも想定される。したがって、今後より効率的あるいは生産性の高い細胞基材を用いたモノクローナル抗体医薬品の開発が進む可能性が高いと考えられるが、CHO や NSO 細胞等の多くの経験のある細胞基材と異なり、あらたに情報や経験を積み重ねていく必要がある。このことは新規有用細胞の使用を避けるべきということではなく、より高い生産能は有効成分の含量の高いバルクハーベストが得られることを意味しており、不純物等の低減化につながる可能性もあり、積極的な取り組みはむしろ推奨されるべき点も多い。

開発過程及び製造工程でウシ由来原材料や TSE の伝播のリスクのある動物種由来の原材料を用いた場合には、「生物由来原料基準」を参照し、妥当性を評価しておくことが必要となる(11)。

### 3. 特性解析

#### 3.1. 一般的要件

モノクローナル抗体医薬品の品質特性解析では、他のバイオテクノロジー応用医薬品と同様に ICH Q6B ガイドライン(6)に従い、抗体の生化学的/物理化学的特性及び生物学的/免疫学的特性等について明らかにすることが求められる。抗体医薬品に特に関連する事項について述べてみたい。構造解析では、一次構造、高次構造、物理化学的特性に関して特性解析を行うことが求められる。DNA 配列によりコードされる一次構造についてはペプチドマッピ

ングやアミノ酸配列分析により確認をしておくことが必要であり、特に後述する C 末端や N 末端のプロセッシングの確認からも重要である。

また、抗体のクラス、サブクラス、軽鎖の構造決定をまず明らかにするべきである。また、IgG4 サブクラスに属するモノクローナル抗体では、一本鎖抗体の存在比についても明らかにしておく必要がある(12)。

#### 3.2. 不均一性

モノクローナル抗体の共通する特徴として翻訳後修飾やプロセッシングにより、製品中に多様な分子集合体が含まれることがあげられる。このようなモノクローナル抗体製品の大きな不均一性については、等電点電気泳動(IEF)、イオン交換クロマトグラフィー(IEC)、キャピラリー電気泳動(CE)など、できる限り多様な手法を用い、あらゆる角度から解析することが必要である。また、ロット間での不均一性の恒常性について示すことも重要である。モノクローナル抗体はその分子量の大きさから、通常の分析手法では十分な分離能を得ることは困難かもしれないが、最新の液体クロマトグラフィーや CE を用いることにより、不均一性に基づく複数のピークを分離することも可能となってきている。全てのマイナーピークについての特性まで明らかにすることは不要と思われるが、可能な限り分子の不均一性を明らかにし、特にメジャーピークについては構造や可能であれば生物活性についても明らかにすることが望ましいといえる。

モノクローナル抗体の不均一性の特徴の一つは C 末端アミノ酸のプロセッシングによる差異があげられる。C 末端のリジン残基は、し



ばしばあるいは完璧にカルボキシペプチダーゼ B 様活性により分解を受けることが知られている。従って、リジン残基の除去の程度について明らかにすることが必要である。また、H鎖 N 末端のアミノ酸はグルタミンやグルタミン酸であることが多く、その一部が自発的に縮合しピログルタミン酸になっていることがあり、このような解析には N 末端ペプチドの質量分析が有用である(図 2)。

抗体医薬品に不均一性を与える要因として翻訳後修飾としての糖鎖の結合があげられる。抗体の代表的な糖鎖構造として、重鎖 Fc 部位に 1 つの N 型糖鎖のコンセンサス結合部位があることがよく知られており、軽鎖にはこのようなコンセンサス糖鎖はない。抗体のコンセンサス糖鎖結合部位に見出される糖鎖構造は基本的にバイアンテナリー構造であり、末端のガラクトース残基の結合の有無により G0、G1、G2 構造と呼ばれている(図 3)。抗体医薬品の糖鎖構造に関しては、コンセンサス糖鎖結合部位の糖鎖構造を含め、全ての糖鎖構造の特性解析を行うと共に、シアル酸の結合の有無についても考慮を払う必要がある。

特に ADCC 活性を持つ抗体医薬品ではコンセンサス糖鎖のフコースの結合の有無が大きく影響することが知られており、結合の有無ばかりでなく結合の有無に基づく不均一性の程度とその恒常性についても明らかにしておく必要がある(13, 14)。また、げっ歯類細胞を宿主として用いる場合には、異種抗原である Gal  $\alpha$  1-3Gal によるアナフィラキシーの報告(15)もあることから、Gal  $\alpha$  1-3Gal 残基の有無、存在が確認できた場合には存在量とロットごとの恒常性についても十分に解析しておくこと

が必要となるであろう。

これまでの製品ではグルコリルノイラミン酸による有害事象については報告がないが、今後大量投与を行うような抗体医薬品の開発ではその安全性について考慮することも必要であろう。

### 3.3. 生物活性や免疫学的特性について

抗体医薬品の生物活性や免疫学的特性は薬理作用と重複することも多いと考えられるが、構造や不均一性との関係なども考慮し、品質特性として可能な限りさまざまな角度から評価しておくことが求められる。有効成分のみならず、分離可能な主要な目的物関連物質の生物活性も評価しておくことが有用である。

また、糖鎖の生物活性に及ぼす影響を評価するために、適用可能であれば糖鎖の一部あるいは全てを除去した抗体分子を用いて生物活性を評価しておくことが望ましい。このような解析により糖鎖構造が生物活性や体内動態に与える影響についても明らかにできるかもしれない。糖鎖の有無が体内動態に影響する可能性のあるときには、モデル動物を用いた生物活性の評価が有用な場合もある。いずれにしても、糖鎖が生物活性や体内動態に重要な役割を担っていることが明らかになった場合には、後述する糖鎖に関する規格試験の設定を考慮し、糖鎖の質的、量的な恒常性を担保することも必要になってくる。ただし、糖鎖試験と生物活性試験は相互補完的な面があり、試験設定においては合理的な判断も可能である。

表 1. 抗体医薬品の生物活性や免疫学的特性：

- 抗体が認識するエピトープの特性解析を含む抗原特異性

- 親和性に関する解離常数 (Kd)
- 補体結合活性や補体活性化能、他の effector 活性の有無
- 細胞傷害活性や抗体依存性細胞傷害活性 (ADCC) の有無
- パラトープ (paratope) (抗原結合領域；エピトープを認識し、結合するモノクローナル抗体の領域) の同定
- 抗体の免疫反応性：比活性 (unit 活性単位/質量)

### 3.4. 特異性と交差反応性

上記したようにモノクローナル抗体が認識するエピトープ (アミノ酸配列や相当する構造単位) を明らかにすることが求められるが、一方安全性の観点から目的としていないエピトープとのモノクローナル抗体の反応性や目的外のヒト組織に対する傷害性について十分考慮することが必要となる。交差反応性については、動物での試験では当然限界があり、また、霊長類を用いたとしても必ずしもヒトに外挿できるわけではない。従って、技術的な限界から、十分な交差反応性の解析は容易ではないと考えられるが、可能な範囲で、免疫組織学的手法を用いて各ヒト組織に対する交差反応性についても明らかにすること安全性確保の点から有用である。

交差反応性について評価すべきヒト組織に関して、EMEA では次のような組織・器官の解析を行うことが推奨されている；扁桃、胸腺、リンパ節、骨髄、血球細胞、肺、肝臓、腎臓、膀胱、脾臓、平滑筋組織を含む胃、腸、膵臓、parotid (耳下腺)、甲状腺、副甲状腺、副腎、下垂体、脳、末梢神経、心筋、骨格筋、卵巣、精巣、皮膚、血管。これは、例示と考えてよいで

あろうが、今後さまざまな技術的進歩—例えば ES 細胞や iPS 細胞の利用により様々なヒト細胞が利用できるようになれば、有用な評価法となってくると期待される。

### 4. 規格試験法

抗体医薬品の規格試験法の設定では、ICH Q6B ガイドライン(6)の原則に従って従来のバイオ医薬品と同様の対応が求められる。特に、抗体医薬品で特に考慮すべき事項としては、確認試験、力価、糖鎖、不均一性の恒常性に関して特別な考慮が必要と考えられる。

抗体医薬品は、共通の基本構造を持つという高い類似性があることから、確認試験設定での特別の配慮が求められる。すなわち、ペプチドマッピングのような非常に特異性の高い試験法を設定するか、高い免疫反応 (例えば ELISA 試験) のように免疫学的特異性を利用した試験法等を考慮すべきであろう。特に、複数のモノクローナル抗体製品を製造あるいは開発している場合には、このような特性の高い確認試験が有用である。

抗体製品の力価/生物活性の規格設定では、可能な限り臨床効果に密接に関連する指標を用いて設定することが望ましいと考えられる。目的とするモノクローナル抗体の主作用が単に目的分子との結合や中和活性のみである場合には、目的物質との結合性を規定する (ELISA 試験のようなアッセイ法) 力価試験が適切であろう。一方、治療効果としてエフェクター活性等を持つ場合には、細胞を用いたアッセイ法や他のエフェクター効果に関連するアッセイ法を考慮することが望ましい。また抗体医薬品であっても、比活性は製造の一定性を担保するための重要なパラメーターであるこ

とから、その設定を行うべきであろう。

抗体医薬品の糖鎖は免疫系細胞の活性化等の生理活性の制御に重要な役割を果たしていることが知られている。従って、抗体医薬品の生物活性として ADCC 等の部位への結合活性の恒常性に影響する可能性がある。ADCC 活性や CDC 活性が知られている抗体医薬品では、これらの生物活性の規格設定の有無を考慮し、糖鎖についての規格設定の必要性を考慮するべきであろう。また、糖鎖が体内動態に影響を与えることが明らかにされている場合には糖鎖に関する規格設定が必要となろう。また、異種抗原として知られている Gal $\alpha$ 1-3Gal を持つことが明らかな場合には、製造における恒常性が十分に担保されない限り、その存在量の規格試験が必要となると考えられる。

また、糖鎖構造に関して、少なくとも G0、G1、G2 の存在量や存在比に関する試験の設定の必要性を考慮するべきであろう。このような規格試験法は、製造における恒常性を担保することに役立つ。

抗体医薬品は極めて高い不均一性を持つことが知られている。従って、製造工程における不均一性の恒常性を担保するために、IEF、イオン交換クロマトグラフィー (IEC)、キャピラリーゾーン電気泳動等のタンパク質の荷電の不均一性を指標とする規格を設定することが望ましいと考えられる。

## 5. 製法変更に伴う同等性・同質性評価

製法工程変更後の同等性・同質性価に関しては、他のバイオ医薬品と同様に ICH Q5E ガイドライン(9)で示されている点に従って評価を行うことが求められる。抗体医薬品開発の特徴

として、臨床開発中においてもかなりの頻度で製法変更が行われていることが挙げられる。これは、抗体医薬品の開発戦略としてターゲットとする抗原は非常に明確であるが、抗原との親和性や生物活性などの細胞や動物を用いた非臨床試験では臨床効果を評価が困難な場合が多いためと考えられる。

抗体医薬品の製法変更での同等性・同質性評価では臨床効果と密接に関連する生物活性/免疫学的特性について特に考慮すべきである。また、糖鎖構造を含む製品の不均一性についても特に配慮するべきであろう。

## D. 結論

抗体医薬品の開発は今後も拡大していくと考えられ、また抗体作成技術を基盤とした多様な製品も開発されてくると想定される。これらの製品の品質や安全性評価に当たっても、従来のバイオ医薬品を適用することができると考えられる。一方で抗体という極めて共通する特性を有する医薬品であることから、開発における基盤技術の共通性ととも、承認申請を含めた評価においても共通のプラットフォームがあることを前提に、より効率的な開発や承認審査が可能になってくるのではないかと考えられる。

一方抗体薬品は、TGN1412 の開発における重大な有害事象発症やリツキサンによる肝炎ウイルスの再燃などこれまでのバイオ医薬品とは大きく異なる副作用も知られてきており、開発段階や承認後にも十分な配慮と注意が必要である(16, 17)。

## E. 参考文献

1. Guidance for Industry for the Submission of Chemistry, Manufacturing and Controls

- Information for a Therapeutic Recombinant DNA-derived Products or Monoclonal Antibody Products for In Vivo Use, CDER/CBER, FDA, 1995.
2. Point to Consider in the Manufacturing and Testing of Monoclonal Antibody Products for Human Use. CBER, FDA 1997
  3. Guideline; Production and Quality Control of Monoclonal Antibodies (EMEA, 3AB4A, 1994)
  4. Draft guideline; Guideline on Production and Quality Control of Monoclonal Antibodies and Related Substances. EMEA/CHMP/BWP/157653/2007, 2007
  5. 医薬審第 329 号「ヒト又は動物細胞株を用いて製造されるバイオテクノロジー応用医薬品のウイルス安全性評価」について (ICH ガイドライン Q5A) . [cited; Available from: [http://www.pmda.go.jp/ich/q/q5a\\_00\\_2\\_22.pdf](http://www.pmda.go.jp/ich/q/q5a_00_2_22.pdf)]
  6. 医薬審第 3 号「組換え DNA 技術を応用したタンパク質生産に用いる細胞中の遺伝子発現構成体の分析について」(ICH ガイドライン Q5B) . [cited; Available from: [http://www.pmda.go.jp/ich/q/q5b\\_98\\_1\\_6.pdf](http://www.pmda.go.jp/ich/q/q5b_98_1_6.pdf)]
  7. 医薬審第 6 号「生物薬品 (バイオテクノロジー応用製品/生物起源由来製品) の安定性試験について」(ICH ガイドライン Q5C) . [cited; Available from: [http://www.pmda.go.jp/ich/q/q5c\\_98\\_1\\_6.pdf](http://www.pmda.go.jp/ich/q/q5c_98_1_6.pdf)]
  8. 医薬審第 873 号「生物薬品 (バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品) 製造用細胞基剤の由来、調製及び特性解析」について (ICH ガイドライン Q5D) . [cited; Available from: [http://www.pmda.go.jp/ich/q/q5d\\_00\\_7\\_14.pdf](http://www.pmda.go.jp/ich/q/q5d_00_7_14.pdf)]
  9. 医薬審第 571 号「生物薬品 (バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品) の規格及び試験方法の設定について」(ICH ガイドライン Q6B) . [cited; Available from: [http://www.pmda.go.jp/ich/q/q6b\\_01\\_5\\_1.pdf](http://www.pmda.go.jp/ich/q/q6b_01_5_1.pdf)]
  10. 薬食審査発第 0426001 号「生物薬品 (バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品) の製造工程の変更にもなう同等性/同質性評価について」(ICH ガイドライン Q5E) .
  11. 生物由来原料基準; 厚生労働省告示第 210 号, 2003
  12. Aalberse, RC. Schuurman, J.: IgG4 breaking the rules. *Immunology* 105, 9-19, (2002)
  13. Natsume A, et al: Fucose removal from complex-type oligosaccharide enhances the antibody-dependent cellular cytotoxicity of single-gene-encoded bispecific antibody comprising of two single-chain antibodies linked to the antibody constant region. *J. Biochem.* 140, 359-368. (2006)
  14. Greenwood J, Clark M, Waldmann H.: Structural motifs involved in human IgG antibody effector functions. *Eur J Immunol.* 23, 1098-1104. (1993)
  15. Chung H. et al.: Cetuximab-Induced Anaphylaxis and IgE Specific for Galactose  $\alpha$ 1,3-Galactose. *New Engl. J. Med.* 358, 1109-1117 (2008)
  16. 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試験・臨床試験について。-TGN1412 事故が医薬品開発に与えたインパクト。 「毒性質問箱」1-32、2008
  17. Perceau G, et al: Late lethal hepatitis B virus reactivation after rituximab treatment of low-grade cutaneous B-cell lymphoma. *Br J Dermatol.* 155, 1053-1056 (2006)