

2009 40048A

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

医薬品規制の国際調和の推進による
医薬品審査の迅速化のための **基盤的研究**

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山口照英

平成22(2010)年 5月

厚生労働科学研究費補助金
医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

医薬品規制の国際調和の推進による
医薬品審査の迅速化のための **基盤的研究**

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山口照英

平成22(2010)年 5月

目 次

I. 総括研究報告

- 医薬品規制の国際調和の推進による医薬品審査迅速化のための基盤的研究..... 1
山 口 照 英

II. 分担研究報告

1. 生物薬品の特性・品質解析、品質試験法の開発に関する研究..... 55
川 崎 ナ ナ
2. 先端バイオ医薬品の生物学的試験法に関する研究..... 69
石 井 明 子
3. 製造方法の異なるバイオ医薬品の有効性の評価試験方法に関する研究..... 79
新 見 伸 吾
4. 遺伝子治療用医薬品の規制に関する国際調和推進のための基盤的研究..... 85
内 田 恵 理 子

資料 ICH considerations: General Principles to Address Virus and Vector Shedding
(ICH 見解： ウイルスとベクターの排出に関する基本的な考え方)

5. 医薬品一般試験法の国際調和を促進するための研究..... 106
川 西 徹

資料1. 製剤総則改正原案

資料2. EP: DISINTEGRATION OF SUPPOSITORIES AND PESSARIES (2.9.2)

資料3. USP: DRUG RELEASE TRANSDERMAL DELIVERY SYSTEMS-GENERAL
DRUG RELEASE STANDARDS<724>

資料4. EP: DISSOLUTION TEST FOR TRANSDERMAL PATCHES (2.9.4)

資料5. USP: AEROSOLS, NASAL SPRAYS, METERED-DOSE INHALERS, AND DRY
POEDER INHALERS <601>

資料6. EP: PREPARATIONS FOR INHALATION: AERODYNAMIC ASSESSMENT OF
FINE PARTICLES (2.9.18)

資料7. USP: VISCOSITY <911>

6. 国際調和された医薬品品質システムの導入・実践の国際調和に関する研究.....	208
檜 山 行 雄	

- 資料 1. 横浜会議の運営委員会への報告
- 資料 2. プロセスバリデーションについてのコメント
- 資料 3. ICH Q-IWG による 2009 年 10 月現在の Q&A
(<http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html>)
- 資料 4. セントルイス会議の運営委員会への報告

7. 臨床試験における海外の規制状況の調査研究.....	249
成 川 衛	

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表.....	258
------------------------	-----

Ⅳ. 研究成果の刊行物・別刷

医薬品規制の国際調和の推進による医薬品審査の迅速化のための基盤的研究

研究代表者 山口 照英 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部長

バイオ医薬品、バイオ後続品、遺伝子治療薬、化学薬品などの幅広い医薬品を取り上げ、これら医薬品の品質特性解析や製法評価、規格試験法や品質管理システム等の国際調和を推進するための基盤的研究として、初年度は以下の研究を行った。

1) バイオ医薬品の製法変更及びバイオ後続品開発における糖タンパク質医薬品の糖鎖の類似性評価法としてnanoLC/MSを利用できることを確認した。また、工程設計及び管理に利用可能な糖鎖恒常性評価技術を開発するためのモデルシステムとして、卵胞刺激ホルモン(FSH)高発現株を樹立すると共に、抗体を用いた精製法を確立した。また、FSH活性測定法を開発した。

2) 代表的な先端バイオ医薬品である抗体医薬品について、日米欧三極における承認とガイドライン策定の現状、およびエフェクター活性の最適化を目的とした改変型抗体開発の国際的動向を明らかにした。また、エフェクター活性の測定法として現在汎用されている末梢血リンパ球を用いた方法の問題点を検討し、エフェクター活性を高精度に測定可能な評価法の開発が必要であることを明らかにした。

3) 製造方法の異なるバイオ医薬品として、CHO細胞、High-5昆虫細胞、マウスミエローマ細胞で製造されたヒト肝細胞増殖因子の活性を生物活性、抗原価及び受容体に対する結合能を指標に検討した結果、製造方法によって活性が異なることが確認され、バイオ後続品の同等性評価における生物活性の重要性が示された。

4) 遺伝子治療薬や腫瘍溶解性ウイルス製品を投与した患者からのウイルス/ベクター排出の評価法として国際調和ガイドラインに盛り込むべき要件を検討し、ウイルス/ベクターの生物学的特性と排出分析法の観点から考慮すべき事項を明らかにした。

5) 医薬品の一般試験法について、製剤総則の大改正に伴い、新たに設定が必要となると考えられる製剤特性の試験をまとめるとともに、諸外国の局方におけるこれら製剤特性に関する試験を調査し、日局への導入の可能性を検討した。

6) ICH（日米EU医薬品規制調和国際会議）のQ8（製剤開発）、Q9（品質リスクマネジメント）及びQ10（医薬品品質システム）の3ガイドラインの実施作業部会での調査検討を通じ、これらのガイドラインの実施に当たって出されていた40を超える疑問点に対してQ&Aを作成すると共に、教育プログラムを構築した。

7) 2005年から開始された欧州における医薬品承認の更新制度等について、欧州医薬品庁等に対する調査を実施し専門家との議論を行った。また関連する文献調査を行い、我が国の将来の制度設計に参考となる情報を収集し、検討すべき要素を明らかにした。

研究分担者

川崎 ナナ 国立医薬品食品衛生研究所
生物薬品部 第一室室長

石井 明子 国立医薬品食品衛生研究所
生物薬品部 第二室長

新見 伸吾 国立医薬品食品衛生研究所
生物薬品部 第三室長

内田 恵理子 国立医薬品食品衛生研究所
遺伝子細胞医薬部 第一室長

川西 徹 国立医薬品食品衛生研究所
薬品部長

檜山 行雄 国立医薬品食品衛生研究所
薬品部 第三室長

成川 衛 北里大学薬学部
医薬開発学准教授

研究協力者

日向 昌司 国立医薬品食品衛生研究所
生物薬品部 主任研究官

伊藤 さつき 国立医薬品食品衛生研究所
生物薬品部

多田 稔 国立医薬品食品衛生研究所
生物薬品部 研究員

鈴木 琢雄 国立医薬品食品衛生研究所
生物薬品部 主任研究官

加藤 くみ子 国立医薬品食品研究所
薬品部 第四室長

A. 研究目的

抗体医薬や改変タンパク質医薬品など新たなバイオ医薬品の開発や、新規 DDS 製剤や分子標的薬などの新たな医薬品の開発が急速に進展している。これらの先端医薬品は従来の医薬品にない概念や画期的な機能を有しているため、その品質、安全性、有効性の担保には新たな評価手法の開発が望まれている。また、先端医薬品のもう一つの大きな特徴は、これまで以上に世界規模での市場をにらんだ開発が行われていることである。従って、医薬品の評価手

法や開発ステージで明らかにしておくべきデータ、あるいは承認申請において求められるデータ等の国際調和の重要が一段と大きくなってきている。さらには、医薬品開発のグローバル化に伴い、医薬品の品質リスク管理においても品質管理システムの導入や試験法の標準化が大きな課題となっている。

本研究においては、抗体医薬品を含むバイオ医薬品、バイオ後続品、遺伝子治療薬、化学薬品などの幅広い医薬品を取り上げ、これらの医薬品の品質特性解析や製法評価、規格試験法や品質管理システム等の国際調和を推進するために、試験法の標準化、あるいは国際調和案の裏付けとなるデータを明らかにすることを目指す。このための基盤研究を行い、国際調和活動や調和文書に盛り込むべき要件を明らかにするものである。今年度は以下の項目について研究を実施した。

- 1) 生物薬品の特性・品質解析、品質試験法の開発に関する研究
- 2) 先端バイオ医薬品の生物学的試験法に関する研究
- 3) 製造方法の異なるバイオ医薬品の有効性の評価試験方法に関する研究
- 4) 遺伝子治療用医薬品の規制に関する国際調和推進のための基盤的研究
- 5) 医薬品一般試験法の国際調和を促進するための研究
- 6) 国際調和された医薬品品質システムの導入・実践の国際調和に関する研究
- 7) 臨床試験における海外の規制状況の調査研究

B. 研究方法

B.1 生物薬品の特性・品質解析、品質試験法の開発に関する研究

B1.1 最終製品の類似性評価

(1) 試薬

日欧米で販売されているエポエチン アルフ

先行品及びエポエチン ベータ（便宜上 epoetin α 1、 α 2、 α 3、 β とする。順不同）及び欧州で販売されているエポエチン アルファ 後続品 3 製剤の一つ（epoetin α 4 とする）、エポエチン ゼータ 2 製剤の一つ（epoetin ζ とする）を用いた。

(2) 製剤からのエポエチン糖鎖の精製

エポエチン製剤を 15%SDS-PAGE ゲルを用いて分離精製した。エポエチンは、Simply BlueTM SafeStain を用いて検出した。このゲルよりエポエチンを含むバンドを切り取り、約 1 mm 角のゲル片にした後、アセトニトリルでゲル片を脱色・脱水し、減圧濃縮遠心エバホレーター（Speed Vac）を用いて、ゲル片を乾燥させた。乾燥ゲル片に 10 mM DTT を含む 25 mM 重炭酸アンモニウム溶液 200 μ l を加え、56°C で 1 時間反応させた後、室温に戻した。還元化溶液を除いた後、25 mM 重炭酸アンモニウム溶液を用いてゲル片を洗浄した。洗浄用溶液を除き、55 mM モノヨード酢酸ナトリウムを含む 25 mM 重炭酸アンモニウム溶液 200 μ l を加え、室温で遮光下 45 分間反応させた。反応後、アルキル化溶液を除き、水でゲル片を洗浄後、50%アセトニトリルを用いてゲル片を脱水し、Speed Vac を用いてゲル片を乾燥させた。さらにゲル片に PNGase F 5 unit を含む 50 mM リン酸緩衝液、pH 7.2、200 μ l を加え、37°C で一晩消化した。消化後、水 300 μ l を加え、30 分間断続的に超音波を照射し、糖鎖を含む抽出液を回収した。抽出液を乾固した後、0.25 M NaBH₄、200 μ l を加え、室温で 2 時間反応させた。反応後、希釈した酢酸を用いて過剰の試薬を分解させ、Envi-Carb を用いて還元化糖鎖を精製した。

(3) LC/MS

HPLC :

装置 : NanoFrontier nLC (日立)

カラム : Hypercarb (0.075 \times 150 mm、

5 μ ThermoFisherScientific)

溶離液 A : 5 mM 酢酸アンモニウムを含む
2%アセトニトリル水溶液 (pH9.6)

溶離液 B : 5 mM 酢酸アンモニウムを含む
80%アセトニトリル水溶液 (pH9.6)

グラジエントプログラム :

B 液 : 5~50% (110 分)

流速 : 200 nl/min

MSⁿ :

装置 : Finnigan LTQ-FT
(ThermoFisherScientific)

イオン源 : nanoESI

キャピラリー温度 : 300°C

キャピラリー電圧 : 1.8 kV

スキャン範囲 (m/z) : 600-2、000

衝突エネルギー : 35%

測定方法 :

- ① Full MS¹ scan
(positive ion mode、分解能 : 50000)
- ② Data-dependent MS²⁻⁴ (positive ion mode)
- ③ Full MS¹ scan
(negative ion mode、分解能 : 50000)
- ④ Data-dependent MS²⁻⁴(negative ion mode)

B.1.2 製造工程評価

(1) ヒト卵胞刺激ホルモン (FSH) α 鎖発現ベクターおよびヒト FSH β 鎖発現ベクターの作製

ヒト FSH α 鎖 (NM_000735) および FSH β 鎖 (NM_000510.2) の cDNA は、Origene 社より入手し、PCR 法でコーディング領域全長をそれぞれ増幅して FSH α 鎖および FSH β 鎖断片を得た。この断片を、クローニングサイトで切断後末端をトポイソメラーゼ付加された発現ベクター、pOpti-VEC および pcDNA-3.3/Neo にそれぞれ組

み込み、クローニングした (pOpti-VEC-FSH α および pcDNA-3.3/Neo-FSH β 、図 2-1 A、1B)。挿入方向は制限酵素のマッピングで確認するとともに、挿入部分の塩基配列を確認した。

(2) ヒト FSH α 鎖/FSH β 鎖発現株の作製

ヒト FSH α 鎖発現ベクター pOpti-VEC-FSH α および FSH β 鎖発現ベクター pcDNA-3.3/Neo-FSH β を CHO-DG44 細胞にリポフェクトアミンを用いて共導入した。遺伝子導入後、G418 (500 μ g/ml) およびメトトレキサート (50 nM) を添加した Opti-CHO 培地で 2 週間セレクションした後、限界希釈法で 48 株クローン化した。メトトレキサート濃度を 500 nM まで順次増加させた。

(3) ヒト FSH α 鎖/FSH β 鎖の発現量の解析

各トランスフェクタントから RNA を抽出し、ランダムヘキサマーをプライマーとして Superscript III キットを用いて cDNA を調製した。ヒト FSH α 鎖および FSH β 鎖に特異的なプライマーを設計し、Light Cycler Fast Start DNA Master PLUS SYBR Green I を用いてリアルタイム PCR を行った。Ct 値から相対発現強度を算出し、GAPDH の発現強度で補正することで各クローンにおける相対発現量を求めた。

(4) ヒト FSH のウェスタンブロット

培養上清および組換えヒト FSH (フォリスチム) を 12.5% SDS-PAGE で分離、PVDF 膜に転写後、1 次抗体として抗ヒト FSH 抗体、2 次抗体として Cy5 標識抗マウス IgG 抗体を用いて蛍光スキャナーで検出した。

(5) 抗ヒト FSH 抗体を産生するハイブリドーマの作製

ヒト下垂体から精製した FSH (MBL) を抗原としてマウスに免疫し、抗体価の上昇を確認後、脾臓を取り出し、ポリエチレングリコール法で

ミエローマ細胞と融合させハイブリドーマを作成した。ハイブリドーマは限界希釈法でクローン化し、抗原とした FSH を固定化したプラスチックプレートを用いた ELISA によって抗体産生を確認した。

(6) 抗ヒト FSH 抗体の評価

BIACORE を用いて、組換えヒト FSH (フォリスチム) を CM5 センサーチップに固定化し、ハイブリドーマ培養上清をインジェクトして結合させた。溶離液として 0.5 M NaCl、4 M MgCl₂、0.1 M Gly-NaOH pH 10、0.1 M citrate-NaOH pH 2.2 を順次インジェクトし、RU 値の減少から溶出量を推定した。

(7) ヒト FSHR の発現ベクターの作製

ヒト FSHR 鎖 (NM_000145) の cDNA は、Origene 社より入手し、末端に Sgf I および Pme I 部位を持つプライマーを用いた PCR 法でコーディング領域全長を増幅して断片を得た。Sgf I および Pme I で消化したヒト FSHR 断片を、pF9A CMV hRluc-neo Flexi の Sgf I/Pme I 部位に組み込み、クローニング後、(pCMV-FSHR-hRluc、図 2-1 C) 挿入部分の塩基配列を確認した。

(8) FSH 応答ルシフェラーゼ発現株の作製

CHO 細胞に cAMP レスポンスエレメント (CRE) をプロモーターに導入されたルシフェラーゼ発現ベクター pGL4.29 (図 2-1 D) を導入し、ハイグロマイシン耐性を利用したセレクションの後、限界希釈法でクローン化した。CRE 応答ルシフェラーゼ発現株は、フォルスコリンを添加した際のルシフェラーゼ活性の誘導能を指標にスクリーニングした。

CRE 安定発現株に FSH のレセプター遺伝子発現ベクター pCMV-FSHR-hRluc をさらに導入し、G418 耐性を利用したセレクションの後、限界希釈法でクローン化した。FSHR 安定発現株は、FSH に依存したルシフェラーゼ活性の増加を

指標にスクリーニングした。

(9) FSH 応答ルシフェラーゼ発現株の評価

2×10^4 cells/well の CFL2 細胞に、FSH の濃度を 4IU から 9 段階の 4 倍希釈液をそれぞれ添加して 6 時間インキュベートした後、ピッカジン試薬を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。同じ実験を 4 回繰り返し実施し、X 軸に対数表示で濃度、Y 軸にバックグラウンドのルシフェラーゼ活性に対する相対活性をプロットした。得られた応答値から Excel のソルバーを用いてシグモイド曲線の近似式のパラメータから IC_{50} 値を求めた。

B.2 先端バイオ医薬品の生物学的試験法に関する研究

学術雑誌に掲載された論文および開発企業からの公開情報等を参考に、抗体の Fc 領域の改変等によるエフェクター活性の最適化に関する調査を行った。

B.3 製造方法の異なるバイオ医薬品の有効性の評価試験方法に関する研究

(1) 試薬

製造方法の異なる組換えヒト HGF (rhHGF) として、研究用試薬として市販されているマウスミエローマ細胞由来、CHO 細胞由来及び High-5 昆虫細胞由来の rhHGF を用い、表示値に従い $5 \mu\text{g/ml}$ となるよう 0.1% 牛血清アルブミン (BSA) を含む PBS に溶解した。

(2) 初代培養ラット肝細胞の DNA 合成の測定

Wistar 系ラットからコラゲナーゼ灌流により得た肝細胞を 5%ウシ胎児血清 (FBS), 10^{-8} M インスリン, 10^{-8} M デキサメタゾン を添加した Williams' E (WE) 培地を用いて 5×10^4 cells/cm² となるようにコラーゲンコートした 24 ウェルマイクロプレートに播種した。培養 2.5 時間後、 $1 \mu\text{g/ml}$ アプロチニンを含む WE

培地に交換し、さらに 18 時間培養した。 $1 \mu\text{g/ml}$ アプロチニン及び 0.1% BSA を含む WE 培地に交換し、rhHGF を各種の濃度で添加した。培養 1 日後、³H 標識チミジン を最終濃度として 60 kBq/ml 添加し、1 日培養した。培養液を取り除き、氷冷 PBS で 2 回洗浄後、10% TCA を添加して 4°C で 2 時間放置した。10% TCA を除去し、1 N 水酸化ナトリウム溶液 0.4 ml を添加し、37°C で 1 時間インキュベーションし、細胞を溶解した。得られた細胞溶解液を遠心チューブに移し、そのうち $32 \mu\text{l}$ をタンパク量の測定に用い、残りの液に、1 N 水酸化ナトリウム溶液 0.65 ml 、 10 mg/ml BSA $12.8 \mu\text{l}$ を加え混合後、さらに 100% TCA 0.2 ml を加えて混合した。氷中で 1 時間放置後、3000 rpm、10 分間、4°C で遠心して得た沈殿に 10% TCA 1.0 ml を加え、沸騰水中で 15 分間放置した。氷中に 5 分間放置後、3000 rpm、10 分間、4°C で遠心した。上清 0.7 ml をアクアゾール 25 ml に加え、液体シンチレーションカウンターで測定した。得られたカウントをタンパク量で補正し、DNA 合成活性を求めた。タンパク量は、クーマシー染色を用いたタンパク質測定液 1 ml を用い、BSA をコントロールとし、595 nm における吸光度より算出した。

(3) ELISA による HGF 抗原価の測定

Quankine[®] Human HGF を用いて操作法に従い測定した。なお、予備的な検討結果から、測定値が同時に測定した検量線の中央部に位置するように、マウスミエローマ細胞、CHO 細胞、High-5 昆虫細胞由来の rhHGF を、それぞれ 3571 倍、758 倍、2500 倍希釈して用いた。

(4) 表面プラズモン共鳴法を用いた rhHGF 受容体-Fc 融合タンパク質との結合能の解析

速度論的解析は、BIACORE 3000 を用い、解析はすべて 25°C で行った。NHS (50 mM) / EDC (200 mM) 溶液 (50/50) で 7 分間活性化させた

CM5 センサーチップに 10 mM 酢酸緩衝液 pH6.0 に溶解した rhHGF 受容体-Fc 融合タンパク質をインジェクトし、1530 resonance unit 固定化した。残存活性基は、1 M ethanolamine でブロッキングした。マウスミエローマ細胞、High-5 昆虫細胞、CHO 細胞由来の rhHGF について、それぞれ 2.5、5、10 nM となるように HBST 緩衝液で希釈し、流速 20 μ l/min で 2 分間の結合、3 分間の解離で得られたセンサーグラムを BIAevaluation software により curve fitting させることで結合速度定数(ka)および解離速度定数(kd)を求め、Kd (kd/ka)を算出した。

B.4 遺伝子治療用医薬品の規制に関する国際調和推進のための基盤的研究

2009 年 6 月付けで発出された「ICH considerations: General Principles to Address Virus and Vector Shedding (ICH 見解: ウイルスとベクターの排出に関する基本的な考え方)」及び関連する論文や資料を基に、ウイルスやベクターの排出と伝播のリスク評価法に関するガイドラインに盛り込むべき、ウイルスやベクターの生物学的特性と排出の分析法の観点で考慮すべき事項について検討した。

B.5 医薬品一般試験法の国際調和を促進するための研究

16 改正日局製剤総則改正案作成作業の間に調べた情報、各国薬局方、医薬品の品質に関連する既存の ICH 国際調和ガイドライン、米国 FDA の関連文書、EMA CHMP の関連文書、インターネットによる検索によって得られる米国および欧州の関連情報、また医薬品の品質、有効性、安全性確保を図る過程あるいは関連する評価技術の開発研究を行う過程で蓄積されてきた経験や知見等を参考に、16 局製剤総則改正にともなって整備が必要な製剤特性の試

験法について整理を行った。

B.6 国際調和された医薬品品質システムの導入・実践の国際調和に関する研究

ICH による Q8 (製剤開発)、Q9 (品質リスクマネジメント) 及び Q10 (医薬品品質システム) の 3 つのガイドラインの実施作業部会 (Implementation Working Group : Q-IWG) の活動に参加し、その目的や検討課題と運営、進捗状況について報告した。

B.7 臨床試験における海外の規制状況の調査研究

欧州において 2005 年度から開始された販売承認の更新制度を中心に、欧州における医薬品の市販後の安全性、有効性の確保に関連する規制制度について、文献及び web-site 情報の調査を行うとともに、EMA (欧州医薬品庁) 等の関係者からヒアリング調査を実施し、情報収集を行った。併せて、米国における関連制度に関しても文献調査等を行い、これらを踏まえて、我が国における関連規制及びその運用のあり方について検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験は「国立医薬品食品衛生研究所動物実験の適正な実施に関する規程」、組換え DNA 実験は、「国立医薬品食品衛生研究所遺伝子組換え実験安全管理規則」に従い、適正に実施した。

C. 研究結果及び考察

C.1 生物薬品の特性・品質解析、品質試験法の開発に関する研究

日本では、これまでに多くの糖タンパク質が医薬品として承認されている (表 1-1)。糖鎖の構造と各糖鎖の結合の比率は製造方法によって変化すること、糖鎖の変化は有効性、安全性に影響を及ぼす場合があることから、製法変更

及びバイオ後続品開発において、最終製品の糖鎖の類似性評価は重要である。一方、製剤の品質を対象とした ICH ガイドライン Q8 で導入された Quality by Design (QbD) アプローチが、バイオ医薬品の原薬製造をも対象とした Q11 に導入されようとしている。これは、バイオ医薬品原薬製造においても、品質を出来上がった製品について検証するのではなく、設計段階から確保しようとする考え方であり、この概念の下では、体系的に品質を確保することが立証されているデザインスペース内での運用は変更とみなされない。デザインスペースの設定には、製品と工程への理解、及び基礎となった製品と工程の開発研究が必要であり、原材料や中間体の品質や特性を適時に計測できる工程解析システム (process analytical technology : PAT) の利用が提案されている。今後、糖タンパク質性バイオ医薬品の製造設計及び工程管理においても、糖鎖の恒常性を保証できる工程をいかに設定するか、また、糖鎖プロファイルの変化をいかに迅速かつ詳細に評価するかが課題になってくると予想される。

我々はこれまで、nanoLC/MS を用いた微量かつ迅速糖鎖解析法を確立し、様々な糖タンパク質の糖鎖構造解析に応用してきた。そこで、本研究では、この方法を 1)最終製品の類似性評価、及び 2)製造工程における恒常性評価に応用することを検討した。最終製品の糖鎖類似性評価では、類似性の高い糖タンパク質の例として、日米欧で販売されているエポエチン アルファ先行品と欧州で承認されたエポエチン アルファ後続品を用いた。また、工程評価のためのモデルシステムを構築するために、卵巣刺激ホルモン (FSH) の実験的製造システムの構築を開始するとともに、FSH の活性測定法を開発した。

C.1.1 最終製品の類似性評価

エポエチンは、ヒトエリスロポエチンと同一

一次構造をもつ糖タンパク質で、分子内に 3 つの N 結合型糖鎖と一つの O 結合型糖鎖が結合している。主な糖鎖構造は、シアル酸が 4 分子結合したフコシル 4 本鎖糖鎖であり、一部の糖鎖に N-アセチルラクトサミン繰り返し構造が存在することが報告されている。日米欧では 1990 年前後にエポエチン アルファ先行品が承認され、最近になって欧州で INN のないエポエチン 3 製剤及び INN エポエチン ゼータ 2 製剤がバイオシミラーとして、また、日本において INN エポエチン カップ製剤がエポエチン アルファ製剤のバイオ後続品として承認された(表 1-2)。糖鎖が異なるエポエチンとしては、他にエポエチン ベータ、epoetin delta、及び epoetin omega などが知られている。エポエチンの糖鎖は血中半減期に影響することから、先行品と後続品の類似性評価は重要である。

そこで、nanoLC/MS を糖鎖の類似性評価に応用することを目的として、まず、SDS-PAGE により、市販の製剤から添加剤等を含まないエポエチンタンパク質のみを分離した(図 1-1)。いずれの製剤も、概ね同様な分子量分布をもつエポエチンを含んでいることが確認された。つぎに、エポエチンを含むゲルバンドを切り取り、それぞれのゲルに PNGase F を作用させて N-結合型糖鎖を切り出した。LC 上でアノマーが分離されるのを避けるため、還元末端を NaBH₄ で還元した後、グラファイトカーボンカラムを用いた LC/MS により糖鎖プロファイリングを行った。

図 1-2 は、ネガティブイオンモードで測定した epoetin α1~4、epoetin β及び epoetin ζ (研究方法B.1.1参照) に由来する N-結合型糖鎖のプロファイルである。クロマトグラムはいずれも類似したパターンを示した。Epoetin α1 の主な糖鎖の構造は、マススペクトルから、シアル酸が 4 分子結合したフコシル 4 本鎖であり、シアル酸部分に 1~5 個のアセチル基が結合していることが確認された (図 1-3)。この特徴的

なアセチル化は、epoetin $\alpha 2$ でも認められたが、epoetin $\alpha 3$ 及び $\alpha 4$ ではアセチル化の程度が低く、epoetin β 及び γ はほとんどアセチル化されていないことが確認された。

以上のように、nanoLC/MS を用いた糖鎖プロファイリングは、製剤中の糖タンパク質の糖鎖の類似性評価法として利用できることが示された。

C. 1.2 製造工程評価

C.1.2.1 ヒト FSH を高発現する CHO 細胞株の樹立

FSH は下垂体前葉から分泌される性腺刺激ホルモンで、女性では、卵巣に作用して卵胞成長、排卵、及びエストロゲン合成を促進させる。男性では、精巣セルトリ細胞に作用して精子形成を促す。ヒト FSH は 92 個のアミノ酸残基からなる α 鎖 1 分子、及び 111 個のアミノ酸残基からなる β 鎖 1 分子から構成される。FSH と同じ一次構造をもつ医薬品として、ホリトロピン アルファ (効能：ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(hCG)との併用で、視床下部または下垂体前葉の機能及び器質的障害に由来する低ゴナドトロピン性男子性腺機能低下症患者を対象とした精子形成を誘導する)とフォリトロピン ベータ (効能：体外受精などの生殖補助技術を受ける患者を対象とした複数卵胞発育のための調節卵巣刺激に適應される)が承認されている。FSH の α 鎖及び β 鎖にはそれぞれ 2 本の *N*-結合型糖鎖が結合しており、糖鎖は血中半減期に影響する。FSH は、糖鎖の恒常性を保証する製造工程の設計や工程管理試験の策定のモデルとして適していると考えられたので、高発現が期待できるジヒドロ葉酸レダクターゼによる遺伝子増幅を利用した組換えヒト FSH 産生系を樹立することとした。

CHO-DG44 細胞にヒト FSH α 鎖発現ベクターおよび FSH β 鎖発現ベクターを共導入し、G418 およびメトトレキサート耐性株 10 クローンを

得た。各クローンの FSH α 鎖および FSH β 鎖の発現量をリアルタイム PCR で解析し、高発現株 DGF-1.7 を得た (図 2-2)。DGF-1.7 細胞を 24 時間培養した上清について FSH レポータージェンアッセイを行った結果、200 IU/ml の FSH 活性が確認された。なお、この活性から含量を推定すると、組換え FSH であるフォリスチム 20 μ g/ml に相当する。また、ウェスタンブロットで確認した結果、予想された分子量が確認された (図 2-3)。

C.1.2.2 抗ヒト FSH 抗体を産生するハイブリドーマの樹立

FSH は、 α 鎖と β 鎖のヘテロダイマーを形成しており、酸性条件で不安定であることが知られている。そこで、アフィニティー精製に適した抗体として、中性領域で溶出可能な抗体を樹立することを目指した。ヒト下垂体から精製した FSH を抗原としてハイブリドーマを作製し、ELISA によって抗体産生を確認し、51 株の陽性クローンを得た。さらに、BIACORE を用いて、アフィニティー精製用として中性領域のマグネシウム塩溶液で解離する抗体 (塩溶出可能抗体)、ウェスタンブロット用抗体として酸性条件化で解離する抗体 (酸溶出可能抗体) を産生するハイブリドーマクローンをスクリーニングした結果、塩溶出可能抗体および酸溶出可能抗体を産生するクローンが複数得られた。このうち抗体価が高かった 3 クローンおよび 2 クローンを再度クローン化して、酸溶出可能抗 FSH モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ #57-5、および塩溶出可能抗 FSH モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ #37-4 を得た (表 2-1)。抗 FSH モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ #57-5 については、ウェスタンブロットに供し、検出可能であることを確認した (図 2-4)。

C.1.2.3 FSH 活性測定用のレポータージェンアッ

セイ用細胞株の樹立

FSH は、そのシグナルの下流に cAMP を生じるため、CRE の応答で活性を定量化することが可能であり、CRE 応答ルシフェラーゼを利用することでレポータージーンアッセイが可能となる。ルシフェラーゼ発現ベクター-pGL4.29 を CHO 細胞に導入し、ハイグロマイシン耐性株 48 クロウンを得た。ハイグロマイシン耐性株について、フォルスコリンによるルシフェラーゼ活性の誘導能を指標にスクリーニングした結果、CRE 応答ルシフェラーゼ発現株 CRE2 を得た(図 2-5)。CRE2 細胞に FSH のレセプター遺伝子発現ベクター-pCMV-FSHR-hRluc をさらに導入し、G418 耐性株 48 クロウンを得た。G418 耐性株について、FSH に依存してルシフェラーゼ活性が増加する株をスクリーニングし、FSH 応答ルシフェラーゼ発現株 CFL36 を得た(図 2-6)。予備的な検討結果であるが、このレポーター細胞を用いて、FSH の応答をソルバーによる非線形解析で評価した結果、極めて良好なシグモイドの近似曲線が得られ、そのパラメータから本アッセイにより IC₅₀ 値が 20 mIU/ml (20 ng/ml 相当)程度で FSH の検出が可能であることが確認された(図 2-7)。

以上のように、FSH 高発現を樹立し、精製用抗体を作製した。また、FSH 活性測定系を確立した。来年度は、nanoLC/MS 及び本活性測定法をベースとして、製造条件を変動させたときの糖鎖や活性の変化を、適時に測定できる手法の開発を行う予定である。

C.2 先端バイオ医薬品の生物学的試験法に関する研究

近年の医薬品開発では、分子標的薬を求める創薬研究の動向に既承認抗体医薬品(本報告書では、抗体医薬品とはモノクローナル抗体医薬品を指し、ヒト血漿由来γグロブリンを有効成分とする医薬品は含まないこととする)の成功が呼応し、抗体作製技術や組換えタンパク質大

量発現・精製技術の進歩も相まって、抗体医薬品がバイオ医薬品開発の主流となっている。日米欧でこれまでに 28 品目の抗体医薬品と、抗体医薬品と類似した構造を持つ Fc 融合タンパク質医薬品 5 品目が承認され(表 3)、バイオ医薬品の売上高の 35%以上が抗体医薬品および Fc 融合タンパク質医薬品によるものとなっている^(1,2)。さらに、化学合成医薬品を含めた世界の医薬品売上高の上位 10 品目のうち 4 品目を抗体および Fc 融合タンパク質医薬品が占めるなど急速な発展を遂げている。現在、臨床開発段階にある抗体医薬品は 140 品目以上にのぼり、ここ数年の間に大幅な承認品目数の増加が予想されている⁽²⁾。欧米では既に、抗体医薬品に特化したガイドラインが策定され(表 4)、我が国でもその必要性が考えられているところである。

抗体医薬品の特徴の一つは、その殆どが IgG 骨格を持ち、品目間で構造上の類似性が高いことである。そのため抗体医薬品では、目的物質の発現及び精製工程、あるいは特性解析において共通性の高い技術の適用が可能となっている。C.1 でも述べたように、現在、ICH では原薬製造に関する Q11 ガイドライン策定に向けた議論が進められ、製造工程の理解と管理に基づき品質確保を計る QbD アプローチを盛り込むことが検討されているが、抗体医薬品は、米国製薬企業グループで作成された QbD による製法確立例示の題材とされるなど、バイオ医薬品の品質管理法確立のケーススタディに適した製品群と考えられている。また、目的物質の構造において共通部分が多い抗体医薬品では、ガイドラインにおいても工程評価や規格及び試験方法の設定において配慮すべき事項を具体的に記述することが可能と考えられることから、ICH ガイドライン Q11 や Q6B 等に付属する各論の作成が検討されるような場合には、対象候補の一つになると思われる。

IgG 骨格を持つ抗体医薬品は、分子量約

150,000 の高分子量糖タンパク質であり、分子構造上の不均一性が存在する。また、高次構造が適切に形成されることが活性発現に必須である。製造工程の解析において、プロセスパラメータと得られたタンパク質画分の生物活性の関連を明らかにすることや、原薬及び製剤の特性解析において、目的物質の不均一性等の特性と生物活性の関連を解析することは、それぞれの解析において有効性・安全性への影響を考慮した検討を行うことになる。そのため、有効性及び安全性に直結した生物活性を迅速かつ高精度に測定する試験法は、製造工程の理解を進める上でも、また、原薬及び製剤の特性を明らかにし規格及び試験方法を考える上でも極めて有用である。そこで本研究では、医薬品開発及び医薬品品質確保の国際調和に関する動向を踏まえ、抗体医薬品について有効性・安全性に直結する生物活性の評価法に関する技術的課題を明らかにし、その課題を解決し得る新しい生物活性評価法を開発することを目指す。

抗体医薬品の生物活性としては抗原との結合およびそれに伴う中和・阻害活性に加え、ナチュラルキラー細胞（NK 細胞）等のエフェクター細胞上の Fc γ 受容体を介した抗体依存性細胞傷害活性（ADCC 活性）および補体を介した補体依存性細胞傷害活性（CDC 活性）が挙げられる。これらは抗体医薬品の抗腫瘍効果に関わる主要なメカニズムの一つである一方で、サイトカイン等の活性中和を目的とする抗体医薬品では安全性上の問題となり得る作用である。抗体の分子構造上、ADCC 活性や CDC 活性は Fc 領域が担っているが、Fc 領域に存在する N 結合型糖鎖の構造により、その活性が変動することが知られている。そのため、これらのエフェクター活性は、製造工程の変動による影響を受ける可能性が高く、製造工程の一定性を確保し、製品の有効性・安全性を担保する上でも重要な評価指標になると考えられる。

本年度は抗体医薬品の生物活性評価法に関

する検討の一環として、抗体の Fc 領域の改変等によるエフェクター活性の最適化に関する開発動向について調査研究を行うとともに、現在行われている抗体医薬品の臨床試験の 8 割近くが癌の治療に関するものである⁽²⁾という状況も踏まえ、抗腫瘍効果に関わる ADCC 活性の評価法について検討した。

抗体医薬品の開発では、マウス抗体からヒト抗体への移行期が過ぎ、現在は、以下のように、目的とする効能効果に適した IgG アイソタイプの選択や Fc 領域の改変等によるエフェクター活性の増強や減弱を目的とした研究開発が進められている。

抗体医薬品の ADCC 活性は、NK 細胞やマクロファージといったエフェクター細胞に発現する Fc γ 受容体が、抗原と結合した抗体の Fc 領域との結合により活性化することにより発揮される。ヒトには Fc γ RI、Fc γ RII、Fc γ RIII の 3 つの Fc γ 受容体サブファミリーが存在し、種々の免疫系細胞において発現が認められるが、特に ADCC 活性に関与するものとして、シグナル伝達を正に制御する Fc γ RIIIa、Fc γ RIIIa および負に制御する Fc γ RIIb が知られている。Fc γ RIIIa には 131R/131H、Fc γ RIIIa には 158F/158V というアミノ酸置換を伴う遺伝子多型が存在し、これらは抗体に対する親和性の違いを有している。対象疾患や抗体医薬品の種類によって異なるものの、高親和性の遺伝子型をもつ患者では抗体医薬品の抗腫瘍活性が高く治療効果も大きいという報告がなされており、抗体医薬品の抗腫瘍活性における活性型 Fc γ 受容体への結合の重要性が *in vivo* レベルで示されている^(4,5)。また、ノックアウトマウス等を用いた実験により抑制性受容体である Fc γ RIIb が抗体医薬品の抗腫瘍活性に抑制的に働くことが報告されている⁽⁶⁾。ヒトの天然型 IgG1~4 はこれら Fc γ 受容体および CDC 活性を担う補体に対して様々な親和性で結合することから、抗体医薬品の開発においては、目

的とする生物活性に応じた IgG サブクラスが選択されるのみならず、近年になって抗体の Fc 領域の改変によるエフェクター活性の最適化が盛んに進められている。

C.2.1 エフェクター活性の増強を目的とした Fc 領域の改変

表 5 にエフェクター活性の増強を目的とした Fc 領域の改変の例を挙げた。IgG と Fc γ 受容体あるいは補体との結合については構造生物学的な解析が詳細になされており、結合に関与するアミノ酸の置換により親和性を増大させる手法が主に用いられている。ADCC 活性を担う主要なエフェクター細胞の一つである NK 細胞は Fc γ 受容体ファミリーの中でも Fc γ RIIIa を特異的に発現すること、抗 CD20 抗体であるリツキシマブの治療効果において先に述べた Fc γ RIIIa の遺伝子多型の関与が認められたことなどから、特に Fc γ RIIIa との親和性の増大を目的とした改変が多く見られる。また、マクロファージや好中球による抗体依存性細胞食作用 (ADCP 活性) に着目して、Fc γ RIIa との結合を高める改変体も開発されている。Fc γ RIIa と抑制型受容体である Fc γ RIIb は細胞外領域の相同性が非常に高く、IgG の両者に対する親和性を完全に分離した改変は困難であることから、Fc γ RII 親和性改変体の評価では、活性型受容体に対する親和性と抑制型受容体に対する親和性の比 (A/I 比) を指標としている点が特徴である。

一方、抗体の Fc 領域の N 結合型糖鎖の構造に着目した開発も行われている。2002 年に Shields ら⁽⁷⁾ および新川ら⁽⁸⁾ によって Fc 領域に結合する N 結合型糖鎖の還元末端に付加するフコースの除去が ADCC 活性を大幅に増強することが報告され、抗体に結合する糖鎖中のフコースの含量を減少させる手法の開発が進んでいる。フコースの付加を直接担う α 1,6 フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) の欠損や抑

制をはじめ、N-アセチルグルコサミン転移酵素 (GnTIII) の過剰発現など N 結合型糖鎖合成経路の改変によりフコース含量の低減が可能な細胞が開発されている。

抗体の Fc 領域の糖鎖は Fc γ 受容体との結合と ADCC 活性の発揮に必須であるが、Sazinsky ら⁽⁹⁾、Jung ら⁽¹⁰⁾ は Fc 領域へのアミノ酸置換の導入により N 結合型糖鎖の無い IgG に Fc γ 受容体との結合能および ADCC 活性を付加することに成功している。これにより大腸菌など、タンパク質への糖鎖付加ができない宿主細胞を用いた抗体産生が可能となり、従来の動物細胞を用いた生産系に比べて大幅な生産コストの削減を望める技術として注目されている。

C.2.2 エフェクター活性の減弱を目的とした Fc 領域の改変

表 6 にエフェクター活性の減弱を目的とした Fc 領域の改変の例を挙げた。エフェクター活性を抑制した医薬品としては既に Eculizumab、Abatacept が承認されている。抗 C5 抗体である Eculizumab は IgG2 と IgG4 のキメラ化により⁽¹¹⁾、CTLA-4 と Fc の融合タンパク質である Abatacept はヒンジ領域へのアミノ酸点変異の導入により⁽¹²⁾ エフェクター活性を抑制している。またアミノ酸配列の改変ではないが、ペプチドと Fc 領域の融合タンパク質 (Peptibody) である Romiplostim は大腸菌によって生産されるため糖鎖修飾をうけず、エフェクター活性を持たないとされている⁽¹³⁾。

IgG1 について Fc γ 受容体や補体との結合モデルから結合能を消失する種々のアミノ酸点変異体で作製されているほか、天然型においても Fc γ 受容体および補体との結合親和性が低い IgG2 や IgG4 に点変異を導入することにより更にエフェクター活性を抑える試みも行われている。

また、抑制型受容体である Fc γ RIIb との結合

親和性を高めるようなアミノ酸点変異により、免疫応答を積極的に抑制するという戦略も用いられている。

C.2.3 エフェクター活性評価法

エフェクター活性の最適化の例を含め、抗体医薬品の研究開発に関する文献では、抗体医薬品の ADCC 活性測定のエフェクター細胞としてヒト末梢血単核球が用いられることがほとんどである。すなわち、健全な提供者から得た末梢血から単核球を単離し、標的とする腫瘍細胞および抗体医薬品とインキュベートすることで、腫瘍細胞への傷害性を指標に ADCC 活性を測定するというものである。この方法は ADCC 活性の測定法として広く用いられ、抗体の Fc 領域の改変においても FcγRIIIa との親和性と比較的高い相関を有することが示されているが、一方で、再現性および目的とする細胞群の確保の面で課題が存在している (C.2.4 参照)。したがって、これらの問題を解決し、製造工程の解析や品質試験への応用も可能な ADCC 活性測定系の開発が今後の重要課題であると考えられる。

C.2.4 エフェクター活性測定系における課題

ADCC 活性をはじめとするエフェクター活性は抗体医薬品の抗腫瘍活性における主要なメカニズムの一つであり、Fcγ受容体との親和性を高めるアミノ酸点変異の導入など、エフェクター活性を増強する様々な改変技術が開発されている。このような技術を導入した抗体医薬品で臨床開発段階にあるものは少なくなく、今後数年の間にはエフェクター活性を増強した非天然型の IgG 骨格をもつ抗体医薬品が市場に出ることが予想されている²⁾。また、エフェクター活性の減弱を目的とした改変体は、先に述べたように既に承認されているものに加え、既に複数の品目が臨床開発後期にある。このような開発動向からも、抗体医薬品の製造工

程評価や特性解析、品質試験、非臨床試験においてエフェクター活性の測定が今後より一層重要な役割を果たすであろうことが伺える。

ADCC 活性の測定法として広く用いられている末梢血単核球を用いた方法には、いくつかの問題点が存在している。まず第一に使用する末梢血単核球のロットの違いによる再現性の問題が挙げられる。単一の提供者から得た末梢血単核球を永続的に使用し続けることは不可能であり、多くの場合、複数の提供者由来の細胞を用いて実験が行われているのが現状である。この際、提供者の年齢・健康状態等による違いに加え、細胞調製時の手法やアッセイに用いるまでの保存状態など様々な要因による影響が予想され、実際、同一の抗体と標的腫瘍細胞を用いた実験でも使用する末梢血単核球のロットの違いにより ADCC 活性に大きな差が生じることが知られている。また、冒頭で述べた Fcγ受容体の遺伝子多型も考慮すべきである。末梢血単核球を用いた実験では特に FcγRIIIa の遺伝子多型の影響が大きいことが知られており、抗体の ADCC 活性を評価する上では実験に用いる細胞の遺伝子型を明らかにし、場合によっては各々の遺伝子型のエフェクター細胞を調製して実験を行う必要がある。しかしながら、提供者の遺伝子型を調べる際には倫理面での配慮が必須であることを含め、常に目的とする遺伝子型をもつエフェクター細胞群を確保することは容易ではない。

さらに目的とするエフェクター活性によっては末梢血単核球を用いることが適切ではない場合もある。末梢血単核球を用いた測定系では主として NK 細胞による細胞傷害活性を検出しており、例えばマクロファージによるファゴサイトーシス活性 (ADCP 活性) を評価することはできない。実際、ADCP 活性の増強を目的として抗体 Fc 領域の FcγRIIa への親和性を向上させた論文のように、末梢血単核球では検出できない活性の変化を分化させたマク

ロファージ細胞を用いて評価した例もある^(14, 15)。マクロファージ細胞への分化は提供者由来の末梢血単核球を用いて数日間かけて行うため、末梢血そのものを用いる場合と同様、遺伝子多型等のロット差が生じることとなり、評価系の一定性の確保は容易でないといえる。

エフェクター活性評価用細胞の安定供給のためには不死化した株化細胞の使用が望ましいが、エフェクター細胞として機能するNK細胞やマクロファージ由来の有用なヒト株化細胞は樹立されていない。抗腫瘍効果を持つ抗体医薬品の評価においては、このような問題を解決し得るADCC活性評価法の開発が今後の重要課題であると考えられる。

C.3 製造方法の異なるバイオ医薬品の有効性の評価試験方法に関する研究

組換えDNA技術を応用して製造された治療用タンパク質（バイオ医薬品）は1980年代に始めて医薬品として承認されて以来、多くのバイオ医薬品が開発・承認された。現在、これらのバイオ医薬品は特許切れを迎えることとなり、それらのバイオ後発品の開発が活発に行われつつあり、その評価研究は急務の課題である。実際、我が国においても成長ホルモンとエリスロポエチンのバイオ後続品が承認されるに至っている。

バイオ医薬品は化学薬品に比べて構造が複雑で、様々な翻訳後修飾を受けるため、製造方法が異なる場合、一次構造は同じであっても翻訳後修飾や高次構造が同一であるかどうかは不明である。したがって、臨床試験を行う前に、有効性評価の一環として生物活性を測定し、バイオ後続品と先発品の同等/同質性を評価することが必要である。さらに、品質特性に違いがある場合においても、有効性及び安全性において先発品と同等/同質性が認められれば承認が可能な場合もありうる。したがって、バイオ後続品は品質特性だけでなく、生物活性の観点か

らも評価を行うことが重要と考えられた。そこで、本研究ではバイオ医薬品の製造方法の違いが活性に及ぼす影響について、劇症肝炎に対する治験が行われている肝細胞増殖因子（HGF）をモデルタンパク質として検証した。CHO細胞、High-5昆虫細胞、マウスミエローマ細胞で製造された3種類の組換えヒトHGF（rhHGF）について、生物活性、抗原価及び受容体に対する結合能を、それぞれ初代培養ラット肝細胞のDNA合成活性、ELISA及び表面プラズモン共鳴法により測定することで比較した。

C.3.1 DNA合成促進を指標としたrhHGFの生物活性の測定

マウスミエローマ細胞由来のrhHGFは、High-5昆虫細胞由来rhHGFと比較してより低濃度でDNA合成を促進した。40 ng/mlにおける最大値は両者で同じであった（図3）。一方、CHO細胞由来のrhHGFは両者よりもDNA合成促進により高濃度必要であり、40 ng/mlにおけるDNA合成活性は両者の約60%であった。マウスミエローマ細胞及びHigh-5昆虫細胞由来のrhHGF 40 ng/mlにおけるDNA合成活性を最大値として50%有効濃度を比較すると、マウスミエローマ細胞由来、High-5昆虫細胞由来、CHO細胞由来rhHGFで、それぞれ2.86 ng/ml, 3.71 ng/ml, 17.1 ng/mlであった。

C.3.2 ELISAによるrhHGF抗原価の測定

ELISAにより求めたrhHGF抗原価の表示値に対する比率を計算すると、マウスミエローマ細胞由来、High-5昆虫細胞由来、CHO細胞由来rhHGFで、それぞれ1.43、1.01、0.338であった（表7）。

C.3.3 表面プラズモン共鳴法を用いたrhHGFのrhHGF受容体-Fc融合タンパク質との結合能の解析

各rhHGFのrhHGF受容体-Fc融合タンパク質

に対する結合の解離速度定数は異なり、マウスミエローマ細胞由来、High-5 昆虫細胞由来、CHO 細胞由来 rhHGF で、それぞれ 0.18 nM, 0.25 nM, 2.69 nM であった (表 8)。

C.3.4 製造方法の異なるバイオ医薬品の有効性の評価試験方法に関する考察

3 種類の製造方法の異なる rhHGF の生物活性、抗原価及びヒト HGF 受容体に対する結合性を比較した結果、各 rhHGF 標品ほどの測定法で比較しても異なる値を示し、標品間の相対強度は全ての測定法で同じ傾向を示した。

測定に用いた 3 種類の rhHGF は、製品の添付資料によると SDS-PAGE あるいは HPLC で 95% 以上の純度であり、不純物及び分解物の含量の違いにより rhHGF の含量が異なる可能性は極めて低い。また、付加している糖鎖が異なることも予想されるが、HGF の糖鎖は活性に影響を及ぼさないことが既に報告されている。したがって、標品間の活性の違いは、高次構造の違いが原因であると考えられる。すなわち、各産生細胞の特性によって、あるいは精製過程の違いにより rhHGF の高次構造が異なるため、生物活性、抗体との結合性、rhHGF 受容体との結合性に差異が観察されたものと考えられる。これに関連し、ELISA では標準曲線の作成に Sf-21 昆虫細胞由来の rhHGF を用いたが、High-5 昆虫細胞由来の rhHGF では表示値と同じ値が得られている点は興味深い。少なくともこの場合は、宿主の起源が同じであれば細胞の種類が異なっても同じ抗原性を有する rhHGF が産生されることを示している。

本研究は研究用の組換えタンパク質を用いて行ったものであるが、治療用タンパク質、バイオ医薬品においても製造方法の違いにより活性が異なる可能性を示した点で興味深い。したがって、バイオ後続品の評価は品質だけでなく活性についても同等/同質性を評価することが極めて重要であることが示された。

C.4 遺伝子治療用医薬品の規制に関する国際調和推進のための基盤的研究

ICH 遺伝子治療専門家会議により、2009 年 6 月に「ICH considerations: General Principles to Address Virus and Vector Shedding (ICH 見解: ウイルスとベクターの排出に関する基本的な考え方) (資料 1) が発出された。ICH 見解では、排出 (shedding) とは、遺伝子治療用ベクターや腫瘍溶解性ウイルスなどを投与した患者から、ベクターやウイルスが患者の分泌物や排泄物を介して拡散することと定義されている。排出は、生体内分布 (患者の投与部位から全身への広がり) とは異なる概念である。ウイルスやベクターの排出は患者家族や医療従事者等の第三者への伝播のリスクや環境中への拡散による環境汚染のリスクがあり、公衆衛生の観点から安全性確保は大きな課題である。ICH 見解では、環境へのリスクについては ICH 各極で規制が異なることから対象からは除外され、第三者への伝播 (transmission) のリスクを把握するための排出の評価に関する基本的な考え方が示されている。

ICH 見解は、序、ウイルス/ベクターの生物学的特性、分析法に関する考慮事項、非臨床での考慮事項 (動物腫、投与量と投与経路、サンプリングの頻度と試験期間、サンプルの採取、非臨床データの解釈と伝播試験)、臨床での考慮事項 (サンプリングの頻度と期間、サンプルの採取、臨床での排出試験データの解釈)、第三者への伝播、の各項目から構成されている。ICH 見解では、非臨床及び臨床での排出試験の実施が適切とされる場合に、推奨されるデザインを提示することに焦点が当てられ、特に、検出に用いる分析法と、非臨床及び臨床試験におけるサンプル採取及びサンプリングスケジュールに関する事項に重点が置かれている。さらに非臨床データの解釈と臨床試験計画の立

案への活用、さらにはウイルス/ベクターの伝播試験の必要性の評価における臨床データの解釈についても提示されている。

遺伝子治療薬や増殖性ウイルス薬は中国等では既に承認された製品があり、これらの製品が治療に用いられている。また、欧米や我が国でも遺伝子治療薬や増殖性ウイルス薬等の臨床開発は活発化しているが、排出の評価は必ずしも適切に実施されていない。ICH 見解はガイドラインとは異なり、規制としての拘束力はないが、このように遺伝子治療薬や増殖性ウイルス製品がグローバルに開発され、世界中で患者に投与されている現状を考慮し、ICH では、今後、本見解をもとにウイルスやベクターの排出と伝播のリスク評価に関する国際調和ガイドラインの作成を検討している。本分担研究では、この国際調和ガイドラインに盛り込むべき事項について、今年度はウイルスやベクターの生物学的特性と排出の分析法の観点から検討した。

C.4.1 ウイルスやベクターの排出と伝播のリスク評価において考慮すべき生物学的特性

ウイルスやベクターの排出と伝播のリスク評価において考慮すべき生物学的特性として、対象となるウイルスや遺伝子治療用ベクターが由来する野生型株の既知の生物学的特性に関する情報は、排出の試験計画を立案するための基本的要件と考えられる。野生型ウイルスの既知の感染/伝播経路や、ウイルスやベクターの一般的な生物学的特性に加えて、ウイルスやベクターの増殖能の有無は、増殖性ウイルスを使用する場合はもちろん、非増殖性のウイルスやベクターの場合でも製造工程や投与後に意図せずに増殖能を獲得することもあるため、考慮すべき重要な生物学的特性である。

癌治療用ベクターとして腫瘍溶解性生菌を用いる方法も開発されているが、ウイルスベクターだけでなく、このような細菌ベクターも排

出を考慮する必要がある。細菌ベクターの場合には、ウイルスベクターの排出評価のためのガイドラインがそのままではまるものではないと考えられるが、その手法や一般的な考慮事項のうちの一部は適用可能と考えられる。

遺伝子治療用ベクターのうち、プラスミドベクターについては、naked DNA として排出されても第三者に伝播することはないと一般的に考えられており、ガイドラインから除外してもよいと思われる。

C.4.1.1 ウイルス/ウイルスベクター

遺伝子治療用ウイルスベクターと腫瘍溶解性ウイルスを以下、ウイルス/ウイルスベクターと呼ぶ。ウイルス/ウイルスベクターでは、ウイルスゲノムの遺伝子改変を行うための工程に関する情報や、組換えウイルス/ウイルスベクターの品質特性の分析は、排出のリスクを評価する上で大変有用と考えられる。排出試験を計画するには、ウイルス/ウイルスベクターの生物学的特性として、感染指向性、増殖特性、遺伝子構造や核酸配列等の分子生物学的特性等を考慮する必要がある。野生型や天然弱毒化ウイルスでは、ウイルスの樹立と選別の経緯に関する情報が特に重要であろう。第三者への伝播のリスクを評価するには、これらの情報に加えて病原性に関わる遺伝子に関する分子解析が大変有用と考えられる。

製品の開発に当たっては、ウイルス/ウイルスベクターが由来する野生型株に関する既知の特性（感染経路、生体内分布、排出経路、潜伏感染と再活性化等）を参照すべきである。またこのような情報はウイルス/ウイルスベクターによる第三者への感染に対する防御法を確立するのにも有効と考えられる。

(1) 増殖能

ウイルス/ウイルスベクターの増殖能は排出評価にあたって考慮すべき重要な特性である。

増殖性ウイルス/ウイルスベクターは患者体内に長期間持続する恐れがあり、患者体内でその量が増える可能性があるからである。このことは排出の可能性を高め、排出期間を増加させ、結果的に伝播の可能性を高めることになる。増殖性ウイルス/ウイルスベクターでは、排出に影響を与える可能性があるため、分子変異体の分析も重要である。

非増殖性ウイルス/ウイルスベクターの場合、製品が排出されたとしても、投与後にその量が増えることはなく、排出は増殖性ウイルス/ウイルスベクターと比べるとはるかに短期間になることが見込まれる。しかしながら、非増殖性ウイルス/ウイルスベクターであっても、製造工程で増殖性ウイルスが生じる可能性がある。従って、製造工程で生じる可能性のある分子変異体の解析を行うことは、製品の品質の観点からも、また排出の考察を行うに当たっても重要である。

遺伝的改変により増殖能を低下させたウイルス/ウイルスベクターでは、その増殖能が復帰したり変異する可能性も考慮する必要がある。非増殖性ウイルス/ウイルスベクターは、患者の体内において、他のウイルスとの組換えや細胞の遺伝子により相補されたり、あるいは細胞の遺伝子との再配列により増殖性を再獲得する可能性がある。

(2) 持続性と潜伏感染

ウイルス/ウイルスベクターの持続性や潜伏感染は排出速度と排出量に影響する。持続性の高いウイルス/ウイルスベクターでは、排出はより長期間に及ぶ可能性がある。潜伏感染/再活性化の可能性があるウイルス/ウイルスベクター（ヘルペスウイルスなど）では、潜伏感染したウイルスが再活性化する可能性を考慮して、より長期間のモニタリングが必要になると考えられる。

(3) 感染指向性と投与/感染経路

ウイルス/ウイルスベクターの感染指向性と投与経路はウイルス/ウイルスベクターを細胞標的に運ぶための重要な要素であり、排出プロファイル及び伝播の可能性に影響を与える可能性がある。

前述の通り、ベクターが由来する野生型株の感染指向性と投与経路に関する情報は排出を考慮する上で必須である。ウイルス/ウイルスベクターの感染指向性が野生型と同じである場合、排出と伝播の経路は野生型のそれを基に推定することができる。例えば、野生型ウイルスが皮膚、血液、体液等との接触によって感染する場合、血液、体液等によるウイルス/ウイルスベクターの排出を考慮すべきと考えられる。また、野生型ウイルスが空気感染または飛沫感染により非接触感染性を示す場合、ウイルスベクターも同様の経路で感染する可能性がある。非接触感染は伝播の可能性を高めると考えられる。

野生型とは異なる細胞/組織特異性を持つように遺伝子改変されたウイルス/ウイルスベクターの場合、排出プロファイルは改変された標的特異性に依存する。

しかし、ウイルス/ウイルスベクターの感染と増殖を許容する細胞、組織、臓器へのターゲティングは、投与したウイルス/ウイルスベクターの感染指向性に加えて、ウイルス/ウイルスベクターと細胞、組織、臓器の接触の程度とも密接に関係する。従って、ウイルス/ウイルスベクターの排出は投与部位及び投与経路に依存し、野生型とは異なる排出プロファイルを示すことが考えられる。例えば、呼吸器系組織に感染指向性を持つ野生型ウイルスに由来するウイルス/ウイルスベクターは、野生型と同様に呼吸器系組織に感染指向性を示すと考えられるが、排出プロファイルは投与経路に依存し、呼吸器内投与、腫瘍内投与、全身性投与では排出プロファイルが異なると考えられる。