

Shibata, H., Saito, H., Yomota, C., Kawanishi, T.	Pharmaceutical quality evaluation of lipid emulsions containing PGE1: alteration in the number of large particles in infusion solutions	<i>Int J Pharm</i>	378	167-176	2009
Sakamoto, T., Portieri, A., Taday, P. F., Takada, Y., Sasakura, D., Aida, K., Matsubara, T., Miura, T., Terahara, T., Arnone, D. D., Kawanishi, T., Hiyama, Y.	Detection of tulobuterol crystal in transdermal patches using terahertz pulsed spectroscopy and imaging	<i>Pharmazie</i>	64	361-365	2009
Izutsu, K., Kadoya, S., Yomota, C., Kawanishi, T., Yonemochi, E., Terada, K.	Stabilization of protein structure in freeze-dried amorphous organic acid buffer salts	<i>Chem Pharm Bull</i>	57	1231-1236	2009
川西 徹	バイオ後続品とは - 開発状況と規制について -	医薬ジャーナル	45	75-79	2009
川西 徹	バイオ後続品の評価	ファルマシア	45	553-558	2009
川西 徹	バイオ後発品 - 国内指針発出と今後の課題	<i>PHARMSTAGE</i>	9	1-3	2009
Yukio Hiyama	Quality Topics: Q-IWG: Quality Implementation Working Group	<i>Proceeding of ICH Japan Symposium 2009</i>		114-122	2009
檜山行雄	品質に関するトピックの動向、Q-IWG:品質実施作業部会	医薬品研究	40	848-852	2009
Tsuyoshi Ando, Yukio Hiyama, Yoshihiro Matsuda, Tamiji Nakanishi, and Haruhiro Okuda	Inside ICH-MHLW: Working groups ramp up quality-based implementation	<i>Pharmaceutical Technology</i>	33	72	2009

第10章 抗体医薬品の構造その他の特性の解明

国立医薬品食品衛生研究所 川崎 ナナ 石井 明子 山口 照英
(独) 医薬品医療機器総合機構 荒戸 照世

はじめに

抗体医薬品の歴史は古く、1993年に改正された生物学的製剤基準には既に20種類もの抗体医薬品が収載されている。これらの抗体は、ウイルス性劇症肝炎や免疫不全症の治療に不可欠な医薬品で、ポリクローナルな免疫グロブリン製剤である。1975年にモノクローナル抗体作製のためのハイブリドーマ技術が確立されてからは、ポリクローナル抗体製剤の開発に代わって、モノクローナル抗体製剤開発への関心が高まった。1991年には国内最初のモノクローナル抗体ムロモナブ-CD3が承認されている。さらに、遺伝子組換え技術によるモノクローナル抗体の作製が可能となってからは、ヒト-マウスキメラ抗体、ヒト化抗体及びヒト抗体などの遺伝子組換え抗体医薬品が続々と開発されるようになった。2009年1月現在、医薬品の国際一般名INNに収載されているモノクローナル抗体医薬品は170品目を超え、米国では21品目、欧州では16品目、また日本でも12品目の遺伝子組換えモノクローナル抗体製剤が承認されている。現在公表されているバイオ医薬品の開発パイプラインにも、様々なモノクローナル抗体が並んでおり、今後もこのような開発動向が続くものと予想される。

抗体医薬品の開発においては、他の遺伝子組換えタンパク質性医薬品と同様に、構造、並びに物理的・化学的性質及び生物学的性質/免疫学的性質などの特性に関する十分な解析が不可欠である。構造その他の特性解析を実施する目的の一つは、有効性・安全性を担保するための規格および試験方法(第11章第1節参照)に必要な事項を明らかにすることであるので、構造その他の特性解析に使用したロットと臨床及び非臨床試験に用いたロットとの関係を明確にすることが重要である。1997年FDAは、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指針(1996年)¹⁾を補完するものとして、モノクローナル抗体医薬品のPoints to Consider (PTC)を発出している²⁾。EMAも、1994年に公表したモノクローナル抗体医薬品に関するガイドライン³⁾の改訂作業を進め⁴⁾、2008年に新しいガイドラインを公表した⁵⁾。我が国においても、抗体医薬品の品質に関するガイドラインの整備を求める声が高まっており、抗体医薬品の構造その他の特性の解明に関する基本的要件を明確にする必要があるだろう。本稿では、(1)抗体医薬品の構造、(2)物理的・化学的性質及び、(3)生物学的性質/免疫学的性質の解析において考慮すべき基本的要件と解析方法について概説する。

1. 構造

タンパク質性医薬品の開発においては、目的タンパク質の基本骨格構造を念頭とした徹底した構造解析を行わなければならない。抗体の基本構造は、同一H鎖2分子と同一L鎖2分子から構成される4本鎖構造であり、構成するポリペプチド鎖の違いにより、IgG、IgD、IgE、IgA、及びIgMの5種類のクラスに分類される。医薬品としては、IgG及びIgM抗体が開発されているが、現在までに日米欧で承認されている抗体医薬品はIgGのみである。IgG抗体はさらにIgG1(図1)⁶⁾、IgG2、IgG3及びIgG4の4つのサブクラスに分類される。国内で販売されている抗体医薬品は主にIgG1であり、一部IgG2、及びIgG4抗体も販売されている。抗体医薬品の構造解析においては、他の遺伝子組換えタンパク質性医薬品と同様に、アミノ酸組成及びアミノ酸配列、N末端及びC末端アミノ酸配列、ペプチドマップ、スルフヒドリル基及びジスルフィド結合、並びに糖鎖構造を明らかにする必要がある。また、細胞毒性を持つ化合物や金属キレート剤が共有結合した修飾抗体においては、化合物の結合数及び結合位置の解析が求められる。抗体医薬品の高次構造は、物理的・化学的分析技術のみにより確定することはできないが、円二色性分析等の分光学的測定や示差走査熱量測定等を補助的に用いたり、生物学的性質/免疫学的性質の評価(後述)に置き換えたりすることができる。

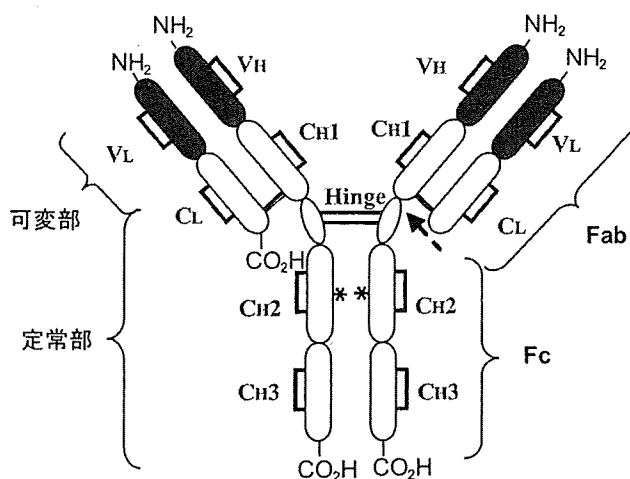


図1 IgG1の構造

— :ジスルフィド結合
* :N結合型糖鎖
← - :ペプシンによる切断部位

1.1 アミノ酸組成及びアミノ酸配列

1.1.1 アミノ酸組成及び配列

アミノ酸組成分析及び配列分析は、目的物質のアミノ酸組成及び配列が、目的物質をコードする遺伝子配列から推定されるアミノ酸組成及び配列に一致するかを確認するために実施する。抗体のような高分子タンパク質においては、アミノ酸組成分析やエドマン分解等による配列分析のみで一次構造を評価することは一般に困難であるので、N末端及びC末端アミノ酸配列(1.1.2 参照)やペプチドマッピング(1.1.3 参照)などの結果を統合して、明らかにする必要がある。

1.1.2 N末端及びC末端アミノ酸, 及びN末端及びC末端アミノ酸配列

末端アミノ酸分析は, N末及びC末アミノ酸の種類及び不均一性の確認のために行う。N末端アミノ酸配列はエドマン分解法により, また, C末端アミノ酸配列は酵素等で逐次遊離することにより直接決定可能である。目的物質をコードする遺伝子配列から推定される末端アミノ酸配列と比較して不均一性が認められた場合は, 各分子体の相対量を適切な分析方法により測定する。抗体医薬品のH鎖N末端は, グルタミンやグルタミン酸残基である場合が多く, それらの一部はピログルタミン酸を形成しているため, エドマン分解法により配列を確認できないことがある。このような場合は, 後述する質量分析法 (MS) を用いたペプチドマッピング (1.1.3 参照) 等を用いてピログルタミン酸の形成を確認し, ピログルタミン酸形成の割合を求める。また, ほとんどの抗体医薬品において, H鎖C末端のリシンの大部分は欠失しており, リシン欠損ペプチド及びリシン含有ペプチドの割合を求める必要がある。C末端アミノ酸配列解析においても, MSを用いたペプチドマッピングが有用である。

1.1.3 ペプチドマップ

ペプチドマッピングは, 主としてタンパク質性医薬品のアミノ酸配列を確認することを目的とした特性解析法の一つである。また, 確認試験法の一つとしても汎用されている。通常, ジスルフィド結合を還元アルキル化した後, トリプシン等で消化し, 生じたペプチド断片を逆相HPLCにより分離・回収する。各ペプチドのアミノ酸組成をMSにより, または, アミノ酸配列をタンデム質量分析 (MS/MS) やエドマン分解により確認し, 目的物質のアミノ酸配列が遺伝子配列から推定されるアミノ酸配列に一致することを確認する。液体クロマトグラフィー質量分析 (LC/MS) を用いてペプチドマッピングを行うと, N末端及びC末端アミノ酸配列の不均一性 (1.1.2 参照), ジスルフィド結合 (1.2 参照), 糖鎖の結合位置と糖鎖構造 (1.3 参照), 人為的修飾 (1.4 参照), 及び分子変異体 (2. 参照) の解析も同時に行うことができる。

図2Aは, LC/MS/MSを用いて得られたあるモノクローナル抗体 (IgG1) のペプチドマップである。分子質量及びMS/MSによって得られたフラグメントパターンからH鎖N末端を含むペプチドを帰属している。図2Bは, そのH鎖N末端ペプチドのマスペクトルで, ピログルタミン酸を含むペプチド (m/z 660.0, 3価) とグルタミン酸を含むペプチド (m/z 665.9, 3価) のおおよその存在比率を示している。図2Cは糖鎖が結合したH鎖断片 (27分に溶出) のマスペクトルである。主なイオンの質量とピーク強度比から, 結合している糖鎖の構造と各糖鎖のおおよその比率を推定することができる。多くの構造情報が得られるLC/MSを用いたペプチドマッピングは, 今後積極的に活用していくことが望まれる。

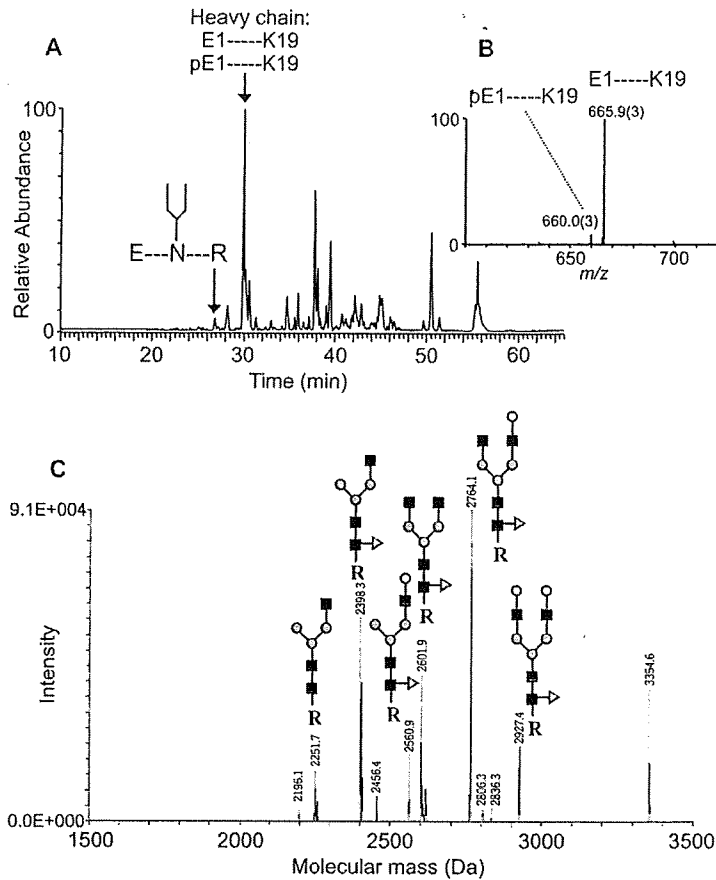


図2 LC/MSを用いて得られたモノクローナル抗体 (IgG1) のペプチドマップ
 A ペプチドマップ, B H鎖N末端ペプチドのマスマスペクトルとN末端アミノ酸残基,
 C H鎖糖ペプチドのマスマスペクトルと主な糖鎖の推定構造
 pE, ピログルタミン酸
 ■, GlcNAc; ●, Man; ○, Gal; ▷, Fuc

1.2 スルフヒドリル基, 及びジスルフィド結合

IgGはL鎖内, H鎖内, L鎖-H鎖間, 及びH鎖間に複数のジスルフィド結合を持つ。スルフヒドリル基及びジスルフィド結合解析は, それぞれジスルフィド結合していないチオール基の割合を明らかにすること, 及び目的とするジスルフィド結合が形成されていることを確認するために実施する。スルフヒドリル基は, 5,5'-ジチオビス (2-ニトロ安息香酸) (DTNB試薬) を用いた比色定量法 (エルマン反応) によって定量する。ジスルフィド結合は, 還元アルキル化処理された抗体及び非還元抗体をトリプシン等で消化した後, LC/MSを用いたペプチドマッピングを行い確認する。

1.3 糖鎖

一般に, ある1つの糖鎖結合部位には, 様々な構造の糖鎖が結合する可能性があり (糖鎖不均一性), その不均一性の変化は, 溶解性, 安定性, 生物活性, 及び体内動態等に影響を及ぼ

すことが知られている。また、非ヒト細胞を用いて製造された糖タンパク質には、*N*-グリコリルノイラミン酸やGal α 1-3Galのように、ヒトに対して抗原性を示す糖鎖が結合している場合がある。遺伝子組換え糖タンパク質性医薬品の開発においては、品質、有効性及び安全性の確保の観点から、糖鎖結合部位、糖鎖の構造、及び部位特異的な糖鎖の不均一性を明らかにすべきであり、糖鎖の結合が確認された場合は、糖鎖構造が有効性及安全性に及ぼす影響を明らかにすることが重要である。

Fabや(Fab')₂断片等からなる一部の抗体を除き、抗体医薬品の多くは糖タンパク質である。IgG1～4を基本骨格とするモノクローナル抗体では、通常、H鎖のCH2ドメインの1箇所共通して*N*結合型糖鎖が結合している。主な糖鎖は、ガラクトースが0～2分子結合したフコシル2本鎖糖鎖（慣用的にG0～G2と呼ばれる）である（図3）。この共通糖鎖の有無を確認した上で、結合糖鎖の構造と各糖鎖の結合の割合を明らかにする必要がある。特に、抗体依存性細胞性細胞傷害（Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity；ADCC）活性及び補体依存性細胞傷害（Complement-dependent cytotoxicity；CDC）活性を利用している抗体医薬品では、それぞれ*N*結合型糖鎖のトリマンノシルコア部分に α 1-6結合しているフコース及び非還元末端ガラクトースがその抗悪性腫瘍活性に大きく影響することが知られていることから⁷⁾、糖鎖構造がADCC活性やCDC活性等のエフェクター活性に及ぼす影響についても詳細に検討すべきである（3.2.2, 3.2.3 参照）。また、可能な限り抗体の体内動態における糖鎖の影響を明らかにしておく必要がある。

可変部に*N*結合型糖鎖のコンセンサス配列（Asn-Xaa-Ser/Thr；XaaはPro以外のアミノ酸残基）が存在する場合、糖鎖が結合している可能性があるため、糖鎖の有無を確認する。可変部の糖鎖構造はG0～G2とは異なる場合も多く、糖鎖構造の詳細と主な糖鎖の結合比率を明らかにする必要がある。事実、マウス由来細胞を用いて製造されたある抗体医薬品の可変部に、非ヒト型糖鎖抗原Gal α 1-3Galを持つ糖鎖が結合していることが明らかにされており、Gal α 1-3Galに対するIgE抗体を持つヒトでのアナフィラキシー発症のリスクが指摘されている⁸⁾。これまでに*N*-グリコリルノイラミン酸による有害事象は特に報告されていないが、抗体は比較的大量に投与されること、また、今後より大量の投与を必要とする製剤が開発されてくる可能性があることから、*N*-グリコリルノイラミン酸に関する十分な特性解析と安全性評価も必要になるかもしれない。

抗体の糖鎖解析法として、単糖に加水分解して分析する方法（単糖組成分析）、糖鎖を酵素等で切り出して分析する方法（オリゴ糖分析）、トリプシン等で糖ペプチドとして解析する方法（糖ペプチド解析）及び糖タンパク質のまま解析する方法（グリコフォーム分析；2.参照）がある。

1.3.3 糖ペプチド分析

糖ペプチド分析は、結合部位毎の糖鎖結合の有無を含む糖鎖の構造と結合比率を明らかにするために、H鎖の共通する結合部位にのみ糖鎖結合が認められた場合は省略してよいが、可変部にも糖鎖結合が認められた場合は、それぞれの部位に結合している糖鎖の構造を明らかにする。HPLCを用いて糖ペプチドを回収した後、糖鎖を切り出してオリゴ糖解析するか、糖ペプチドの質量分析を行う。LC/MSを用いたペプチドマッピングを実施している場合は、糖ペプチドのマスマスペクトルから糖鎖構造を推定する(図2C)。

1.4 人為的修飾(キレート化剤, 細胞傷害作用をもつ化合物, 及びPEG結合等)

現在までに、放射性同位元素を配位させるためのキレート化剤や、細胞傷害作用を有する化合物を抗体に共有結合させて特定の細胞に作用させるターゲット療法剤がすでに販売されており、今後、ポリエチレングリコール結合(PEG化)抗体等の国内申請が行われる可能性がある。このような修飾抗体では、修飾抗体のペプチドマップと未修飾抗体のペプチドマップを比較することによって、修飾剤の結合数と結合位置を解析することが望ましい。

2. 物理的・化学的性質

タンパク質性医薬品の特徴は、不均一な分子の集合体であることである。抗体医薬品において不均一性が存在する要因として、凝集、断片化、N末端グルタミン酸またはグルタミン残基のピログルタミン酸形成、H鎖C末端リシン残基の欠失、アスパラギン酸残基の異性化、アスパラギンの脱アミド化、メチオニン残基の酸化及びジスルフィド結合の誤り等ポリペプチド鎖上に生じた分子変化(分子変異体)、並びに糖鎖の不均一性が知られている。分子構造上の不均一性の有無や程度は、MS、電気泳動法、及びHPLCなどで確認することができる。不均一性が認められた場合は、それぞれの分子をHPLC等により分離し、構造と存在比を明らかにするとともに、必要に応じて可能な範囲で生物活性を測定し、目的物質に匹敵する活性を有する目的物質関連物質であるか、活性を持たない目的物質由来不純物であるかを明確にしなければならない。

2.1 質量スペクトル

質量が異なる分子変異体や糖鎖構造の異なる分子を識別することが可能である。抗体医薬品を非還元状態で測定する場合、分子量が大きいために同位体の存在によりイオンピークがブロードになるが、C末リシンの脱離(128Da)、糖鎖のガラクトース残基数(162Da)の違いによる分子種の違いなどを識別することができる。

2.2 電気泳動パターン

分子量の違いで分子種を分離する SDS-PAGE と、等電点の違いにより分離する等電点電気泳動及びキャピラリー等電点電気泳動がある。

還元条件下で IgG の SDS-PAGE を行うと、50 ~ 60kDa に H 鎖、25 ~ 30kDa に L 鎖が検出される。非還元条件下で行った場合は 150 ~ 200kDa に 4 本鎖抗体が検出される他に、凝集体、断片、1 本鎖、及びジスルフィド結合の誤りによって生じた分子が検出される。

抗体医薬品の等電点電気泳動及びキャピラリー電気泳動では、C 末端リシン残基の有無、脱アミド体、及びシアル酸結合数等の違いによって生じたアイソフォームが分離される。後述するイオン交換 HPLC (2.3.2 参照) を用いて分析した結果を含め、分子の荷電からみた不均一性について明らかにすべきである。

2.3 液体クロマトグラフィーパターン

2.3.1 サイズ排除クロマトグラフィー

2 量体及びその他の凝集体 (高分子量体) の存在を確認する。H 鎖及び L 鎖の単鎖の存在、4 本鎖体形成不全体や、Fab 断片または Fc 断片等分解物の測定にも利用できる。純度試験や苛酷試験の評価にも用いられる。

2.3.2 イオン交換クロマトグラフィー

主に陽イオン交換カラムが汎用されている。還元体、非還元体でそれぞれ分析する。脱アミド体、一方または両方の H 鎖 C 末端リシン欠失体、一方または両方の H 鎖の N 末がグルタミン酸残基であるもの、グルコース付加体、シアル酸付加体、メチオニン酸化体、H 鎖断片、L 鎖断片、Fab 断片及び Fc 断片などが検出される。検出したピークの構造を可能な範囲で質量分析等により明らかにする。

2.3.3 疎水性クロマトグラフィー

抗体をパパインで切断すると定常部のヒスチジンとスレオニン残基間が切断され、2 分子の Fab 断片と 1 分子の Fc 断片が生じる (図 1)。これを疎水性 HPLC で分析すると、遊離システインの存在、メチオニン等の酸化や一部アミノ酸の変化 (例: アスパラギン酸の異性化変化) などを確認することができる。

3. 生物学的性質/免疫学的性質

生物学的性質は、目的物質が作用する対象を試験系に含む生物学的試験により評価される特性である。特性解析プロファイルを確立する上で、生物学的性質の評価は物理的・化学的性質の評価と同様に必要不可欠なものであり、重要な生物学的性質として、特定の生物学的効果を発揮するための特異的な機能やその程度を表したものが生物活性である。

抗体医薬品の生物活性と期待される効能効果は品目ごとに異なるが、大きく(1)増殖因子やサイトカイン、あるいはそれらの受容体等に結合して、標的分子が関わる生体内反応を抑制する活性を持つ品目、(2)細胞膜表面分子と結合し、ADCC活性やCDC活性により抗腫瘍効果を発揮する品目、及び(3)抗ウイルス作用を持つ品目などに分類される。また、複数の生物活性を担う抗体医薬品も知られている。これらの他、生体反応をミミックする作用を持つアゴニスト抗体の開発等も進められている。

生物活性を測定するためにどのような生物学的試験(バイオアッセイ)が有用であるかは品目ごとに異なり、臨床効果やその分子機構を考慮して開発メーカーが提示する必要があるが、一般に抗体の生物学的試験は、「抗原との結合性試験」及び「培養細胞等を用いる機能評価試験」に大別される。前者は、抗原や抗体の種類によらず、試験法の共通性が高いが、後者は、抗原や抗体の特性に応じて試験法が異なる。目的とする生物活性以外の活性の有無を特性解析で十分に検証することにより安全性等に関わる有用な情報が得られることも多く、個々の品目の特性を十分に評価し得る適切な生物学的試験法の確立が求められる。

なお、抗原との結合性試験により評価される特性は、抗体医薬品の免疫学的性質でもある。他のタンパク質性医薬品と異なり、抗体医薬品では免疫学的性質が生物学的性質の一部でもあることから、本稿では抗原との結合特性を生物学的性質に含めて記載する。

生物学的試験は、目的物質の構造と活性の相関や、分子変異体の生物学的性質を知るためにも活用される。そのような場合、生物活性の差異を定量的に示す必要があるが、生物活性を定量的に表す尺度は力価であり、単位で表される。抗体医薬品のように標準品が存在しない場合は、特性解析した自家標準物質を確立しておき、試験結果は自家単位で表示する。抗体医薬品原薬の生物活性は、物質あたり力価(単位/mg)、あるいは標準物質の活性と比較した相対力価(%)で表される。また、生物学的試験は、薬理試験の一つとして実施されることが多いが、生物活性は構造を反映したものであるため、承認申請にあたっては、試験結果を構造その他の特性に適切に反映させることが求められる。

3.1 結合性試験

結合性試験において明らかにすべき主な事項は、標的抗原に対する結合親和性であり、抗体が認識するエピトープ、抗原と類似したタンパク質（抗原と構造の類似した分子や動物における相同タンパク質）に対する交差反応性、組織学的結合性等について検討することも有用である。結合性試験に用いられる主な方法を以下に述べる。

3.1.1 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

プレートに固相化した抗原に結合した抗体医薬品を定量する。濃度の異なる抗体医薬品希釈液を調製して各濃度における結合量を測定し、標準物質の試験結果との比較により相対力価を算出することができる。競合法と非競合法があり、競合法では抗原との特異的結合を評価することができる。

3.1.1.1 競合法ELISA

抗原をプレートに固相化して、非標識の抗体医薬品と標識した抗体医薬品を競合的に結合させる。抗体医薬品の標識にはビオチンが用いられることが多く、ストレプトアビジン標識した酵素を結合させ、固相に結合した酵素活性を指標として抗原に結合した抗体医薬品を定量する。

3.1.1.2 非競合法ELISA

抗原をプレートに固相化して抗体医薬品を結合させ、さらに酵素標識した抗体（例えば抗ヒトIgG抗体）を結合させる。固相に結合した酵素活性を指標として抗原に結合した抗体医薬品を定量する。

3.1.2 表面プラズモン共鳴 (Surface Plasmon Resonance : SPR) 解析

分子間の結合あるいは解離に伴ってセンサーチップ表面で生じる微量な質量変化をSPRシグナルとして検出できる装置を用い、抗原をセンサーチップに固定して、緩衝液、抗体医薬品試料、緩衝液の順にセンサーチップ上に供給することにより、抗原との結合および解離をリアルタイムに測定する⁹⁾(図4)。抗体をセンサーチップに固定する場合や、複数の試料をセンサーチップ上に順に供給する場合もある。SPR解析では、親和性(解離定数)、結合・解離の速さ(結合・解離速度定数)を評価することができる。また、抗体を標識せずに解析できる利点がある。

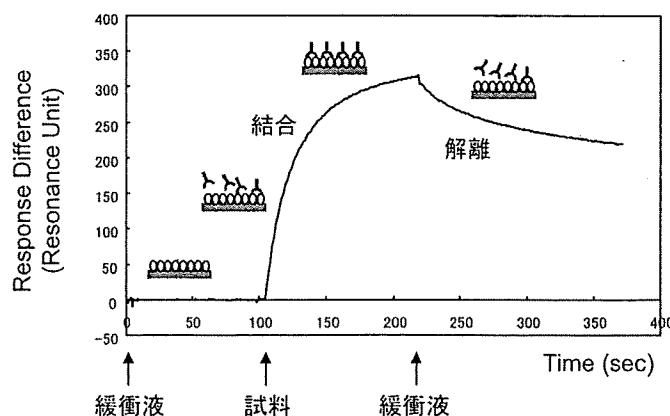
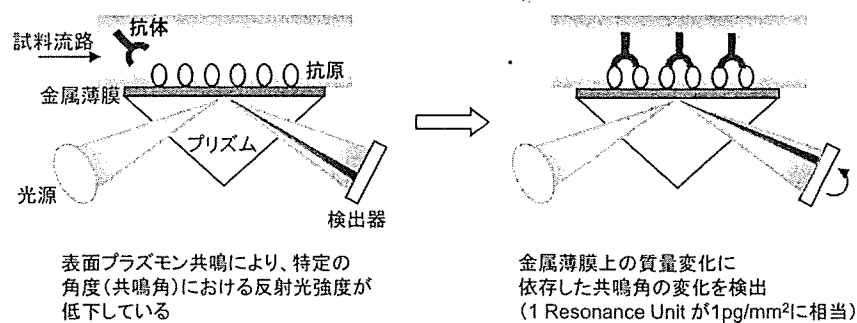


図4 SPR解析の原理とセンサーグラム例

3.1.3 抗原発現細胞を用いた結合特性評価

抗原発現細胞を用いた抗体の結合性試験では、生理的条件に近い状態の抗原との結合性を評価することができる。 ^{125}I 標識した抗体医薬品の濃度を変化させて抗原への特異的結合量を測定し、スキッチャードプロット解析することにより解離定数を算出することができる。 ^{125}I 標識した抗体医薬品の濃度を一定にし、非標識抗体(目的物質あるいはその他の抗体)の濃度を変えて ^{125}I 標識した抗体医薬品の結合量を測定することで、特異性を評価することもできる。

抗原発現細胞に結合した抗体医薬品に蛍光標識抗体を結合させ、フローサイトメトリーにより抗体の結合を検出することも可能であり、この場合は、抗体医薬品の相対的な結合量と、抗体医薬品が結合した細胞の割合を知ることができる。抗原非発現細胞を対照として用いることにより、特異性を評価することができる。

また、種々の細胞パネルへの結合を解析することにより、抗体医薬品の結合特異性の評価を行うことも可能である。

3.2 培養細胞等を用いた機能評価試験

機能評価試験では、抗体医薬品との結合により、抗原を介した生体反応がどのように変化する

るかを試験する。抗体医薬品や抗原の特性に応じた試験法を確立する必要がある。

3.2.1 中和活性試験

サイトカインや増殖因子、あるいはその受容体などを標的とする抗体医薬品の場合、細胞のサイトカイン等への応答に対する抗体医薬品の抑制効果を試験する。抑制効果の指標として、細胞増殖や細胞傷害が用いられることが多い。受容体のリン酸化、生理活性物質の放出、レポーター遺伝子の発現などが指標として用いられることもある。また、抗ウイルス抗体医薬品の場合には、ターゲットとするウイルスによる指標細胞の細胞変性効果 (CPE) やプラーク形成の阻害を指標として生物活性を測定することも可能である。

3.2.2 抗体依存性細胞性細胞傷害 (ADCC) 活性

ADCC活性は、標的細胞の表面抗原に結合した抗体のFc部分にFc γ 受容体保有細胞(エフェクター細胞)がFc γ 受容体を介して結合し、エフェクター分子を放出することにより標的細胞を傷害する活性である(図5)。主なエフェクター細胞としては、ナチュラルキラー細胞と、好中球、マクロファージ、好酸球などの骨髄系細胞がある。前者はエフェクター分子としてパーフォリンとグランザイムを放出し、後者は活性酸素などを放出する。

ADCC活性は、 ^{51}Cr で標識した標的細胞と抗体を反応させた後、エフェクター細胞を加えて反応させ、上清中に放出された ^{51}Cr を定量することにより評価することができる。簡便な方法として、上清中の乳酸脱水素酵素(LDH)活性を指標にADCC活性が評価されることもあるが、LDHはエフェクター細胞からも放出され得ることに注意が必要である。抗体のCH2ドメインに結合した糖鎖における末端シアル酸やコアフコースがADCC活性に影響することが知られている⁷⁾。

3.2.3 補体依存性細胞傷害 (CDC) 活性

CDC活性は、標的細胞の表面抗原に結合した複数の抗体のFc部分に結合した補体C1 (C1q)がその高次構造変化により活性化され、これに続く補体活性化古典経路により膜侵襲複合体が形成されて標的細胞膜に埋め込まれることにより、細胞溶解を起こす活性である(図5)。

CDC活性は、標的細胞に抗体と補体を加えて反応させた後、生存細胞数を測定することにより評価できる。抗体のCH2ドメインに結合した糖鎖末端のガラクトース、Nアセチルグルコサミン、マンノースがCDC活性に影響することが知られている⁷⁾。

ADCC活性やCDC活性による細胞傷害が生じるには、抗体のFab領域を介した抗原との結合とFc領域を介したエフェクター細胞や補体との結合の両方が必要であるため、エフェクター活性の試験では、FabとFc両領域の機能を合わせた評価を行っていることになる。

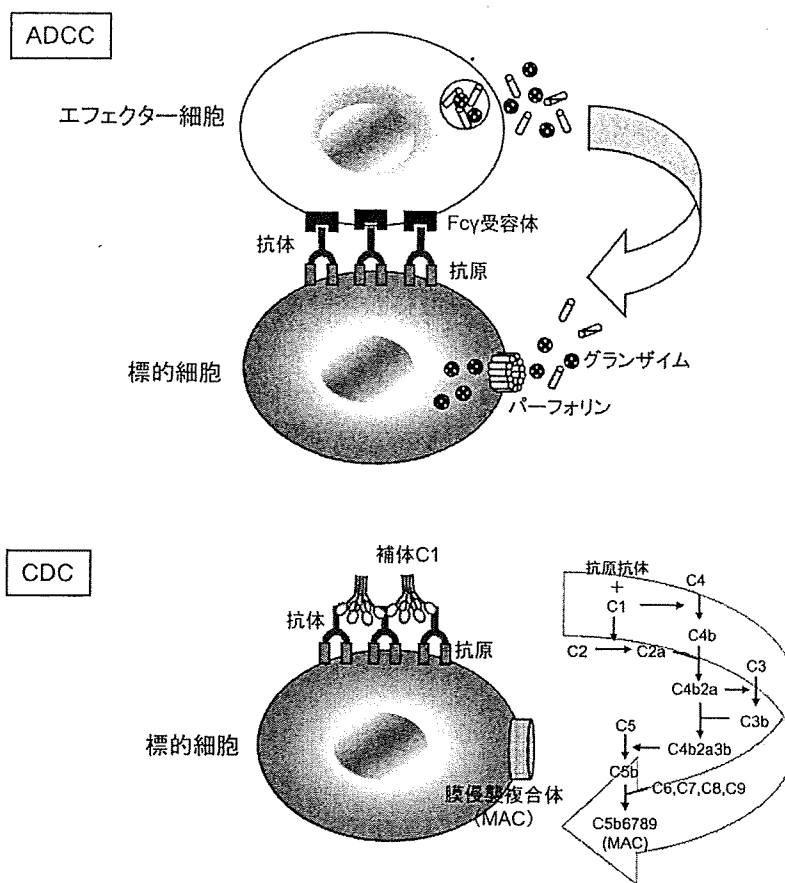


図5 ADCC活性およびCDC活性による細胞傷害

おわりに

本稿では、現在販売されているIgG抗体を対象として構造その他の特性解析の基本的要件について概説した。現在、修飾抗体、融合抗体、一本鎖抗体、複数の特異性を持つ複合抗体、あるいはIgMのような巨大分子(900kDa)等の医薬品への応用も検討されており、それらの基本骨格を考慮した構造その他の特性解析についても考察していく必要があるだろう。また、最近の分析技術の進歩はめざましく、最新の優れた分析技術を積極的に導入していくことが重要である。

参 考 文 献

- 1) Guidance for Industry; For the Submission of Chemistry, Manufacturing, and Controls Information for a Therapeutic Recombinant DNA-derived Product or a Monoclonal Antibody Product for *in vivo* Use, CDER/CBER, FDA, 1996.
- 2) Points to Consider in the Manufacture 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) Concept Paper: On the Need to Revise the Guideline on Production and Quality Control of Monoclonal Antibodies (3AB4A, Revision December 1994) .
- 5) Guideline on Development, Production, Characterisation and Specifications for Monoclonal Antibodies and Related Products (EMEA, 18 December 2008, EMEA/CHMP/BWP/157653/2007) .
- 6) 川崎ナナラ. ステムを知れば薬がわかる. Pharm. Tech. Japan, 23, 283-289, 2007.
- 7) Raju TS. Terminal sugars of Fc glycans influence antibody effector functions of IgGs. Curr. Opin. Immunol. 20, 471-478, 2008.
- 8) Chung CH. et al.: Cetuximab-Induced Anaphylaxis and IgE Specific for Galactose α 1,3-Galactose. New Engl. J. Med. 358, 1109-1117, 2008.
- 9) Cooper MA. Optical Biosensors in drug discovery. Nat. Rev. Drug Discov. 1, 515-528, 2002.

JPTI 2010

The Japanese Pharmacopoeia Technical Information 15th Edition Supplement 1-2

日本薬局方 技術情報 2010

第十五改正第一追補/第二追補対応

財団法人 日本公定書協会 編

「日本薬局方技術情報 2010」の記述について

- 1 「日本薬局方技術情報 (JPTI)」は日本薬局方の規格、試験方法等の解釈及び試験操作上の注意事項等の技術的情報を掲載しています。2010年版では第十五改正日本薬局方の第一追補、第二追補及び一部改正を中心に技術的情報が必要な項目を選択してまとめています。なお、参考として技術情報の前には第十五改正以降の改正を反映させた条文を掲載しています。
- 2 通則、製剤総則、一般試験法、参考情報に関する技術情報としては、解説・解釈・試験操作上の注意点・考え方等を掲載しています。
- 3 医薬品各条については、生薬、添加物及びその他の必要な品目の情報のみに限定して関連する技術情報を掲載しています。特に確認試験、純度試験、定量法の項目ではご協力をお願いした企業から提供された実測データを掲載しています。
- 4 適否の判定に必要な情報として一部の生薬の鏡検写真を掲載し、また色調での判定の際の参考に供するために一部の生薬及び漢方処方エキス剤の確認試験のTLCデータを掲載しています。
- 5 各記述については、原理・原則は簡潔な記載に留めてあります。
- 6 薬局方における国際調和の動向を記述しています。
- 7 本書に記述されている「商品名」などは、試験などを行う際の参考に示したものであり、特定の商品を推奨したり、代替可能な同等以上の他の商品を排除するものではありません。試験担当者の専門的な知識による裁量により、試験などを実施してください。

編 集 委 員	大久保恒夫	川西 徹	合田 幸広	小嶋 茂雄
	棚元 憲一	柘植 英哉	○寺尾 允男	徳永 裕司
	早川 堯夫	松田 芳久	四方田千佳子	
執筆者及び校閲者	青柳 伸男	内田恵理子	大内 正	大橋 史明
	岡田 敏史	川崎 ナナ	川原 信夫	木内 文之
	菊地 祐一	合田 幸広	小嶋 茂雄	小松かつ子
	近藤 健児	佐々木次雄	嶋田 康男	関口 道子
	棚元 憲一	徳永 裕司	那須 正夫	早川 堯夫
	淵野 裕之	松田 芳久	森口 展明	山口 進康
	山本 恵一	山本 恵司	山本 藤輔	四方田千佳子

20. 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に用いる細胞 基材に対するマイコプラズマ否定試験

局方条文

本文書は、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に使用する細胞基材で細胞バンクを基にするものに対し、現段階で実施すべきと考えられるマイコプラズマ否定試験について述べたものである。

試験方法としては、A. 培養法、B. 指標細胞を用いたDNA染色法、C. ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)による検出法が挙げられる。

本マイコプラズマ否定試験の対象は、マスター・セル・バンク(MCB)、ワーキング・セル・バンク(WCB)及び医薬品製造工程中の培養細胞である。これらに対して、A法とB法による試験を実施する。ただし、B法はマイコプラズマ由来以外のDNAも検出するので、B法のみ陽性を示した場合はC法によりマイコプラズマの存在を否定することも考えられる。この場合、C法に用いるプライマーその他の試薬や反応条件を含めた試験方法の選択、方法の感度と特異性及び検体調製の妥当性を含め、マイコプラズマの存在を否定できると判定した合理的な理由を示す必要がある。

マイコプラズマ否定試験を実施する前には、検体がマイコプラズマ発育阻止因子を有するかどうか試験しておく必要がある。発育阻止因子が含まれる場合には、遠心分離、細胞の継代などの適切な方法により発育阻止因子を中和あるいは除去する。

検体を採取後24時間以内に試験するときは2～8℃で、24時間を超える場合は-60℃以下で保存する。

マイコプラズマが検出された場合、種を同定するための試験を行えば混入の原因を推定するのに役立つ可能性がある。

A. 培養法

1. 培地

培養法にはカンテン平板培地と液体培地の両方を使用する。両培地にはペニシリン以外の抗生物質を使用してはならない。使用する培地としては、生物学的製剤基準に記載されているものを参考にする。ただし、2.の培地の性能試験に適合するものであれば他の培地でもよい。

2. 培地の性能試験

試験に用いる培地については、各ロットごとにマイコプラズマの発育性能に関し、適性であるか否かの試験を実施する。そのためには、少なくとも2種類の既知の菌株、デキストロース分解マイコプラズマ(*M.pneumoniae* ATCC 15531又は同等の種又は株)とアルギニン分解マイコプラズマ(*M. orale* ATCC 23714又は同等の種

又は株)を陽性対照として加えた培地での試験をその都度実施し、これらの既知のマイコプラズマが検出できることを確認しておく必要がある。陽性対照試験に使用するマイコプラズマ株は、公的又は適切と認められた機関より入手後適切に管理された継代数の低いもので、100 CFU(コロニー形成単位)以下又は100 CCU(色調変化単位)以下で培地に接種する。

3. 培養及び観察

1) カンテン平板培地1枚当たり検体(細胞懸濁液)0.2 mL以上を、プレートに均等に広がるように接種する。カンテン平板培地は1検体当たり2枚以上とする。検体を接種した後、カンテン平板培地表面を乾燥し、5～10%の炭酸ガスを含む窒素ガス中(微好気的条件)で、適切な湿度のもと $36 \pm 1^\circ\text{C}$ で14日間以上培養する。

2) 液体培地1本当たり検体(細胞懸濁液)10 mL以上を、100 mLの液体培地を入れた容器に接種する。液体培地は1検体当たり1本以上とし、 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ で培養する。

被検細胞の培養液中に抗生物質などのマイコプラズマ発育阻止因子が含まれているような場合には発育阻止因子を除去する必要があるが、遠心処理などはそうした目的に適している。マイコプラズマ発育阻止因子の測定は、生物学的製剤基準に記載されているマイコプラズマ発育阻止活性の試験を参考にできる。

3) 2)での培養開始後3日目、7日目及び14日目の計3回にわたり、それぞれ各液体培地より0.2 mLずつを採取し、カンテン平板培地各2枚以上に接種する。カンテン平板培地での培養は微好気的条件下で、 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ で14日間以上培養する。

4) 全カンテン平板培地を対象に7日目と14日目に100倍以上の倍率の顕微鏡でマイコプラズマの集落の有無を調べる。

B. 指標細胞を用いたDNA染色法

試験操作法の妥当性についてあらかじめ検討するため、培養Vero細胞に100 CFU以下又は100 CCU以下の*M. hyorhinis*(ATCC 29052, ATCC 17981又は同等の種又は株)及び*M. orale*(ATCC 23714又は同等の種又は株)を接種する。

マイコプラズマ汚染の検出に関して既知のものと同等以上の検出感度があることを示すデータがある場合は上記以外の指標細胞やマイコプラズマ菌株を本試験に使用することもできる。マイコプラズマ菌株は、公的又は適切と認められた機関より入手後適切に管理された継代数の低いものにつき、接種単位をあらかじめ設定した上で使用しなければならない。細胞は適当と認められた細胞保存機関からマイコプラズマが検出されていないことを確認したデータと共に入手しなければならない。入手した細胞は、マイコプラズマ混入を避けて注意深く培養し、多数の種ストックを作製して、本文書で示すいずれか一つ以上の方法でマイコプラズマの混入を否定した後、凍

結保存する。試験にはこのストックを解凍し、6継代以内のものを使用しなければならない。

カバーグラスを沈めた培養ディッシュ又は同等の容器に指標細胞を接種し、1日増殖させる。この培養ディッシュ2枚以上に試験検体（細胞培養上清）1 mL以上を接種する。

試験には、陰性（非接種）対照及び2種類のマイコプラズマ陽性対照をおく。陽性対照には、例えば *M. hyorhinis* (ATCC 29052, ATCC 17981 又は同等の種又は株) 及び *M. orale* (ATCC 23714 又は同等の種又は株) 100 CFU 以下又は 100 CCU 以下を使用する。

細胞は5%炭酸ガスを含む空气中 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ で3~6日間培養する。

カバーグラス上の培養細胞を固定後、ビスベンズイミダゾール (bisbenzimidazole) 又は同等の染色剤により DNA 蛍光染色し、蛍光顕微鏡 (倍率 400~600 倍又はそれ以上) でマイコプラズマの存在を鏡検する。陰性対照及び陽性対照と検体を比較しマイコプラズマ汚染の有無を判定する。

方法

1) 細胞培養用ディッシュ (直径 35 mm) に滅菌したカバーグラスを無菌的に置く。

2) 10% ウシ胎児血清 (あらかじめマイコプラズマがないことを確認しておく) を含むイーグルの最少必須培地中に Vero 細胞が 1 mL 当たり 1×10^6 細胞となるように細胞懸濁液を調製する。

3) Vero 細胞懸濁液 2 mL を各培養ディッシュに接種する。このときカバーグラスを培地中に完全に沈め、培地表面に浮かないように注意する。細胞がカバーグラスに接着するよう 5% 炭酸ガスを含む空气中 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ で1日培養する。

4) 培地を新鮮な培地 2 mL と交換した後、試験検体 (細胞培養上清) 0.5 mL を培養ディッシュ2枚以上に添加する。陰性対照と陽性対照 (*M. hyorhinis* (ATCC 29052, ATCC 17981 又は同等の種又は株) 及び *M. orale* (ATCC 23714 又は同等の種又は株) 等の2種類のマイコプラズマ) についても同じ操作を行う。

5) 培養液を5%炭酸ガスを含む空气中 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ で3~6日間培養する。

6) 各ディッシュより培養液を除去し、メタノール/酢酸 (100) 混液 (3:1) (固定液) 2 mL をそれぞれに加え、5分間放置する。

7) 各ディッシュより固定液を除去し、再度各ディッシュに同量の固定液を加え10分間放置する。

8) 固定液を除去し、すべてのディッシュを完全に風乾する。

9) 各ディッシュにビスベンズアミド (bisbenzamide) 蛍光染色液 2 mL を加え、ディッシュに蓋をして室温で30分間静置する。

10) 各ディッシュより染色液を吸引除去し、ディッシ

ュを蒸留水 2 mL で3回洗浄する。カバーグラスを取り出し乾燥する。

11) カバーグラスに封入液を滴加して封入する。余分な封入液をカバーグラスの端より吸い取る。

12) 400~600 倍又はそれ以上の倍率の蛍光顕微鏡で観察する。

13) 検体と陰性対照及び陽性対照の顕微鏡像を比較する。

14) 細胞核を囲むように微小な核外蛍光斑点を持つ細胞が1000個のうち5個 (0.5%) 以上あれば陽性と判定する。

C. ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) による検出法

PCR 法は、非常にわずかな量のマイコプラズマ DNA を特異的に検出することが可能な方法として現在ではよく知られており、細胞のマイコプラズマ汚染の検査法として、近年広く利用されてきている。しかし、その感度と特異性は採用した方法に依存し、また PCR で陽性反応を得てもそれは必ずしも生きたマイコプラズマの存在を意味するものではない。

PCR 法では培養細胞から得た DNA を特異的なプライマーを用いて増幅することによって目的 DNA の有無を検出する。試験の検出感度と特異性を高めるには2段 PCR 法 (ネステッド PCR 法) を用いることが望ましい。試験は陽性対照 (例えば 100 CFU 以下又は 100 CCU 以下の *M. hyorhinis* (ATCC 29052, ATCC 17981 又は同等の種又は株)) と陰性対照を置き実施する。

細胞又は細胞培養液に含まれるマイコプラズマ DNA を増幅するにはマイコプラズマに共通な DNA 配列に対応するプライマーを用いる。増幅に際しては耐熱性 DNA ポリメラーゼのような適切なポリメラーゼを用いる適切な条件下で反応を行う。増幅した DNA をアガロースゲル電気泳動を用いて分離し、エチジウムブロマイド染色後、UV 照射により検出する。

本法で重要な点は、マイコプラズマに特異的で、かつ広範囲のマイコプラズマによく保存されている塩基配列に対応するプライマーを用いることである。例えばマイコプラズマの 16S-23S リボソーム遺伝子間のスペーサー領域等に対応するプライマーがある。

1次 PCR で陰性となった場合には、感度と特異性を高めるためネステッドプライマーを用いる2段 PCR 法を実施することが望ましい。

2次 PCR に用いるプライマーは内側配列部分のネステッドプライマーを選択する。アウター及びインナープライマーは実験的又は文献的に有効性と特異性が証明されていないなければならない。

なお、Vero 細胞を用いて検体中に存在する可能性があるマイコプラズマの増殖を図った後に PCR を行い、感染性マイコプラズマ由来の DNA の検出精度を高める方法もある。

以下に2段 PCR 法の例を示す。試薬や反応条件につ

いては、例示に限らず、適切であることが確認されている場合にはそれを使用してもよい。他の方法を使用する場合は、用いた方法の妥当性が立証され、その詳細が記載されていなければならない。その中に方法の感度と特異性が示されていなければならない。

操作法の例

1. テンプレートの調製

1) 被験細胞懸濁液（必要ならば Vero 細胞により継代する）600 μ L をチューブにとり、細胞を 0.1% SDS 等で溶かし、同量の TE 緩衝液（10 mmol/L トリス-塩酸 (pH 8.0), 1 mmol/L EDTA）を飽和したフェノールを加え、混合する。

2) 室温で 15000 rpm, 5 分間遠心する。

3) 上清 400 μ L を別のチューブに移し、3 mol/L 酢酸ナトリウム 10 μ L を加える。

4) エタノール (95) 1 mL (2.5 倍量) を加え、十分に攪拌する。15 分間氷冷した後、4 $^{\circ}$ C で 15000 rpm, 10 分間遠心する。

5) 上清を除去し、沈殿を 80% エタノール 200 ~ 300 μ L で 1 ~ 2 回洗浄し、洗液はピペットで除去する。4 $^{\circ}$ C で 15000 rpm, 10 分間遠心後、上清を完全に除去し、沈殿を乾燥する。

6) 沈殿を精製水 40 μ L に溶解する。

2. 陽性対照、陰性対照についても同様の処理を行う。

3. 1 段階 PCR

1) 耐熱性 DNA ポリメラーゼ、dNTP 溶液、アウタープライマー、反応緩衝液 (Mg イオンを含む) を混合し、1 本のチューブに 90 μ L ずつ分注する。

2) 調製したテンプレートより 10 μ L をとり、1 段階の PCR 反応液 (90 μ L) を入れたチューブ 1 本ずつに加える。

3) 94 $^{\circ}$ C で 30 秒間の変性、プライマーに適した温度 (例示のプライマーの場合は 55 $^{\circ}$ C) で 2 分間のアニーリング、72 $^{\circ}$ C で 2 分間の伸長を、30 回繰り返し DNA 増幅を行う。

4. 2 段階 PCR

1) 耐熱性 DNA ポリメラーゼ、dNTP 溶液、インナープライマー、反応緩衝液 (Mg イオンを含む) を混合し、1 本のチューブに 99 μ L ずつ分注する。

2) 1 段階の PCR を終了したチューブから、それぞれの生成物 (1 μ L) をとり、2 段階の PCR 反応液 (99 μ L) を入れたチューブ 1 本ずつに加える。

3) 94 $^{\circ}$ C で 30 秒間の変性、プライマーに適した温度 (例示のプライマーの場合は 55 $^{\circ}$ C) で 2 分間のアニーリング、72 $^{\circ}$ C で 2 分間の伸長を、30 回繰り返し DNA 増幅を行う。

5. アガロースゲル電気泳動

1) 1 段階及び 2 段階の PCR 生成物 (10 μ L) を、泳動の先端を確認するための適当な色素液 (2 μ L) と混合し、1% アガロースゲル電気泳動を行う。

2) アガロースゲルをエチジウムブロマイドにより染色し、紫外線照射条件下で写真撮影する。

3) DNA バンドが検出された場合、陽性と判定する。

[プライマーの例示]

・マイコプラズマ検出用

アウタープライマー

F1: 5'-ACACCATGGGAG(C/T)TGGTAAT-3'

R1: 5'-CTTC(A/T)TCGACTT(C/T)CAGACCCA
AGG-CAT-3'

インナープライマー

F2: 5'-GTG(G/C)GG(A/C)TGGATCACCTCCT-3'

R2: 5'-GCATCCACCA(A/T)A(A/T)AC(C/T)
CTT-3'

() は混合

[PCR 反応液]

	[1 段階]	[2 段階]
dNTP 溶液 (各 1.25 mol)	16 μ L	16 μ L
プライマー (10 pmol/ μ L)	F1 2 μ L	F2 2 μ L
プライマー (10 pmol/ μ L)	R1 2 μ L	R2 2 μ L
耐熱性 DNA ポリメラーゼ (1 U/ μ L)	2 μ L	2 μ L
反応緩衝液		
25 mmol/L 塩化マグネシウム	8 μ L	8 μ L
10 倍緩衝液*	10 μ L	10 μ L
滅菌精製水	50 μ L	59 μ L

*10 倍緩衝液の組成

2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-	100 mmol/L
1,3-プロパンジオール・塩酸 (pH 8.4)	
塩化カリウム	500 mmol/L
塩化マグネシウム	20 mmol/L
ゼラチン	0.1 g/L

[Vero 細胞中でマイコプラズマを増殖させる方法]

1) 試験検体、陽性対照及び陰性対照について、それぞれ 2 枚以上のディッシュを使用する。

2) 細胞培養用ディッシュ (直径 35 mm) に、10% ウシ胎児血清 (PCR によりあらかじめマイコプラズマ DNA が検出されないことを確認しておく) を含むイーグル最少必須培地を用いて調製した Vero 細胞懸濁液 (1×10^6 細胞/mL) を 2 mL ずつ加え、5% 炭酸ガスを含む空气中、 36 ± 1 $^{\circ}$ C で 1 日培養する。

3) 古い培地を新鮮な培地と交換し、試験検体 (細胞培養上清) 0.5 mL を Vero 細胞の培養ディッシュ 2 枚以上に接種する。陽性対照 (例えば 100 CFU 以下又は 100 CCU 以下の *M. hyorhinis* (ATCC 29052, ATCC 17981 又は同等の種又は株)) と陰性対照についても同じ操作を行う。

4) 試験検体、陽性対照並びに陰性対照を接種した