

201034016A

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22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山口 照 英

平成23(2011)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22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山口 照 英

平成23 (2011) 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・・・・・・・・・・ 49
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・・・・・・・・・・ 59
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・・・・・・・・・・ 69
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・・・・・・・・・・ 75
内 田 恵 理 子
5. 医薬品一般試験法の国際調和を促進するための研究・・・・・・・・・・ 85
川 西 徹

資料1 日局 注射剤の不溶性微粒子試験法 (6.07)

資料2 USP PARTICULATE MATTER IN INJECTIONS<788>

資料3 EP PARTICULATE CONTAMINATION: SUB-VISIBLE PARTICLES (2.9.19)

資料4 日局 製剤均一性試験法 (6.02)

資料5 USP: UNIFORMITY OF DOSAGE UNITS <905>

資料6 EP: UNIFORMITY OF DOSAGE UNITS (2.9.40)

資料7 日局 崩壊試験法 (6.09)

資料8 USP DISINTEGRATION <701>

資料9 EP DISINTEGRATION OF TABLETS AND CAPSULES (2.9.1)

資料10 日局 溶出試験法 (6.10)

資料11 USP DISSOLUTION <711>

資料12 EP DISSOLUTION TEST FOR SOLID DOSAGE FORMS (2.9.3)

| | |
|--|-----|
| 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・・・・・・・・ | 157 |
| 檜 山 行 雄 | |

資料1 ICHQ8Q9Q10 QIWG 教育研修資料

- 教育資料番号0 事例研究
- 教育資料番号1 Welcome 講演
- 教育資料番号2 ICHQ8Q9Q10 の相乗効果
- 教育資料番号3 開発事例
- 教育資料番号4 審査における留意点
- 教育資料番号5 製造および品質システム
- 教育資料番号6 GMP 査察
- 教育資料番号7 デザインスペース
- 教育資料番号8 管理戦略
- 教育資料番号9 品質システム
- 教育資料番号10 品質リスクマネジメント
- 教育資料番号11 Q-IWG アップデート(東京)

資料2 タリン会議運営委員会への報告

資料3 ICH Q-IWG による2010年11月現在のQ&A

資料4 福岡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・・・・・・・・ | 261 |
| 成 川 衛 | |

| | |
|-----------------------------|-----|
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・ | 269 |
|-----------------------------|-----|

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 客員研究員

本研究では、抗体医薬品などのバイオ医薬品、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、試験法の標準化、あるいは国際調和案の裏付けとなる科学的データの取得や、調和を目指す試験法を評価するための先導的な研究を行うことを目的として研究を実施した。今年度の成果は以下のとおりである。

- 1) バイオ医薬品の製法変更およびバイオ後続品の製法開発における参照品との同等性/同質性評価法を開発することを目的として、モデルとなる組換えヒト卵巣刺激ホルモン（FSH）の実験的製造システムを確立した。LC/MSを用いたFSHの糖鎖構造解析により、培地の血清添加の影響は認められなかったが、細胞基材が異なると明らかな相違が認められ、LC/MSは同等性・同質性評価法として利用できる可能性が示唆された。また、FSHのレポータージーンアッセイ/表面プラズモン共鳴（SPR）イムノアッセイによる比活性測定法を開発し、同等性/同質性評価法として利用できる可能性を示した。
- 2) バイオ医薬品として最も開発が進む抗体医薬品の生物活性評価法に関する研究として、Fcγ受容体発現細胞株を用いたcell-based binding assay及び抗原発現細胞とFcγ受容体発現細胞を用いたcell bridging assayを確立し、品質試験法としての有用性と技術的課題を考察した。
- 3) 製造方法の異なる二種類の抗 VEGF 抗体医薬品の有効性の評価試験法として、VEGF によるHUVEC 細胞増殖促進に対する阻害を指標とする生物活性測定法の有効性を評価した。その結果、前者は抗 VEGF 抗体医薬品生物活性測定法としての有用性が示唆された。
- 4) 遺伝子治療用ベクター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に盛り込むべき要件について検討を行った。特に非臨床試験及び臨床試験での排出試験のあり方と伝播のリスク評価の観点から考察した。
- 5) 医薬品の一般試験法の中で、既に日米欧三薬局方で国際調和された製剤試験について、各局方への取り込み状況を調べ、非調和部分、および取り込み時に生じた新たな相違点を整理するとともに、非調和部分の解消の方向性について考察した。
- 6) ICH（医薬品規制国際調和会議）の製剤開発・品質リスクマネジメント・医薬品品質システムの3ガイドラインに関する実施作業部会（Implementation Working Group：Q-IWG）の活動に参加し、Q-IWG 教育プログラムを基に日米欧で実施した教育研修会等を通じてこれらガイドラインに関する理解を促進するとともにガイドラインの導入・実践における課題を明らかにした。
- 7) 欧州における医薬品承認の更新制度の運用状況、米国における医薬品の市販後試験の実施及びそのフォローアップシステム等に関して文献調査等を行い、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 | |
| 橋井 則貴 | 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 第一室長 |
| 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 |
| 栗林 亮佑 | 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 研究員 |
| 多田 稔 | 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 研究員 |
| 加藤 くみ子 | 国立医薬品食品研究所 薬品部 第四室長 |
| 大島 裕希 | 国立医薬品食品衛生研究所 薬品部 |

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。今年度は以下の分担研究課題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

B.1.1 組換えヒト卵胞刺激ホルモン (FSH) の作製

(1) 抗 FSH 抗体カラムの作製

昨年度樹立した抗 FSH 抗体を産生するハイブリドーマ (#3.22) の培養上清濃縮液を HiTrap Protein G カラムを用いて精製し、抗体溶液とした。NHS-activated HiTrap カラムに抗体溶液を添加し、エタノールアミン溶液でブロッキングして抗 FSH 抗体カラムとした。

(2) FSH の培養工程

昨年度樹立した組換えヒト FSH を安定に高発現する CHO-DG44 細胞株 (DGF1 細胞) を、10%ウシ胎仔血清を添加した Opti-CHO 培地 (S 培地)、あるいは無血清の Opti-CHO 培地 (SF 培地) に 1×10^6 個/mL で播種し、3~4 日間、8% CO₂ の気流下、37°C、125 rpm で巡回培養した。培養液を回収し、350 x g、15 分間遠心分離し、培養上清と細胞を分離した。回収した細胞は、S 培地あるいは SF 培地に再懸濁後、細胞数を計測し、次の培養に用いた。この培養工程を 6 回繰り返す、ロット 1~6 とした。

(3) FSH の精製工程

回収した培養上清は、6000xg、10 分間、遠心分離し、上清をポアサイズ 0.45 μ m のフィルターで濾過した後、限外濾過膜 PELXL を用いたタンジェンシャルフローフィルトレーションで濃縮した。それぞれの培養上清濃縮液を抗 FSH 抗体カラムにアプライし、280 nm の吸光度が 0.01 au 以下になるまで PBS で洗浄後、2 M アルギニン溶液もしくは 2 M MgCl₂ 溶液で溶出し、1000 倍量の PBS に対し一昼夜透析した。

(4) FSH のタンパク質濃度の測定

作製した組換えヒト FSH のタンパク質濃度は、BIAcore 3000 を用いた表面プラズモン共鳴 (SPR) イムノアッセイで測定した。SPR 解析は、すべて 25°C で行った。検量線は FSH 製剤であるフォリスチム注 150 溶液の 2 倍希釈系列 (0.234~15 μ g/mL) を用いて作成し、検量線から、Excel で近似式を求めた。

B.1.2 組換えヒト FSH の糖鎖構造解析

(1) 還元アルキル化 FSH の調製

脱塩した FSH (12 μ g) を 50 μ L の 8 M グアニジン-HCl / 0.5 M Tris-HCl (pH 8.6) に溶解後、最終濃度 40mM の dithiothreitol (DTT) で 65°C、30 分間、遮光下で加熱し、タンパク質を還元した。次いで、最終濃度 96 mM のモノヨード酢酸ナトリウムで室温、暗所で 40 分間反応させて、システイン残基のチオール基をカルボキシメチル化した。反応終了後、脱塩し、還元アルキル化 FSH とした。

(2) 糖鎖の切り出し

還元アルキル化 FSH を 100 mM EDTA を含む 50 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0) 50 μ L に懸濁後、5 ユニットの N-Glycosidase-F を加えて、37°C で 24 時間反応させて N 結合型糖鎖を切り出した。反応溶液に、冷エタノール (最終濃度 60%) を加えて、-20°C で 2 時間インキュベートした後、遠心分離によりタンパク質を除去した。遊離した N 結合型糖鎖を含む上清を乾燥させて、糖鎖を回収した。

(3) 還元化糖鎖の調製

乾燥糖鎖試料を 250 μ L の 0.5 M NaBH₄ 溶液に溶解後、室温で 16 時間還元した。反応溶液を中和後、糖鎖の回収は、グラファイトカーボン樹脂を固定相とした ENVI Carb C カートリッジを用いて行った。試料溶液を注入して、糖鎖を樹脂に吸着させた後、1 ml の 5 mM AcONH₄ で樹脂を洗浄し、1.5 ml の 45% アセトニトリル / 5 mM AcONH₄ 溶液で糖鎖を溶出させた。得られた溶液より還元化糖鎖試料を調製した。

(4) LC/MS

液体クロマトグラフィーは Paradigm MS4 (Michrom BioResources) を使用した。溶離液は 2% アセトニトリルを含む 5 mM NH₄HCO₃ (A 溶媒) 及び 80% アセトニトリルを含む 5 mM NH₄HCO₃ (B 溶媒) を使用

し、流速は 500 nl/min に設定した。質量分析装置はナノエレクトロスプレー (nanoESI) イオン源 (AMR) を接続した Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer (FT-ICR-MS) (装置名: LTQ-FT, Thermo Fisher Scientific) を使用し、ポジティブイオンモード及びネガティブイオンモードでデータを取得した。

(5) 主成分分析 (PCA)

各糖鎖のピーク面積百分率に関する情報を用いて、多変量解析ソフト Simca-P+ (Umetrics) により、第 2 主成分まで計算して PCA を行った。

B.1.3 ヒト組換え FSH の比活性の評価

(1) レポータージーンアッセイ

昨年度樹立した FSH レセプターと CRE で発現制御されるルシフェラーゼ発現単位を有する CHO 細胞株 (CFL-C3 細胞) をアッセイ用細胞として用いた。CFL-C3 細胞を 10% F12 培養液でマイクロプレートに 4×10^4 個/well ずつ播種し、18~24 時間培養した。培養上清を除き、標準 FSH 溶液 (フォリスチム注 150 を 10% F12 培養液 1 mL で希釈し、0.2、1.0、3.9、15.6、62.5、250 および 1000 mIU/mL を含むように調製したもの)、および試料溶液 (SPR イムノアッセイで測定したタンパク質濃度を基に、組換え FSH を 10% F12 培養液 1 mL で希釈し、0.2、0.1、0.39、1.56、6.25、25 および 100 ng/mL を含むように調製したもの) を 200 μ l 添加し、4 時間培養した。ルシフェラーゼ活性測定は、ピッカジーンデュアルシーパンジーキットを用いて測定した。培養液を除き、ルシフェラーゼ活性測定用細胞溶解液を 45 μ l 加え、室温で 15 分間放置後、攪拌し、ルシフェラーゼ活性測定用溶液とした。この液 5 μ l を 96 ウェル発光測定用マイクロプレートへ移し、ホタル・ルシフェラーゼ発光試薬を 45 μ l 添加し、マイクロプレートリーダーで発

光量を測定した。さらに、ウミシイタケ・ルシフェラーゼ発光試薬を 45 μ l 添加し、同様に発光量を測定した。

(2) 比活性の算出

ホタル・ルシフェラーゼ発光量をウミシイタケ・ルシフェラーゼ発光量で補正後、FSH 無添加培養における発光量に対する相対比を算出した。5 パラメータロジスティックモデルの近似式 $f(x) = \varepsilon + (\alpha / (1 + (X/\delta)^{-\gamma}))^{\beta}$ を用い各変数 (α : E_{max} 、 β : 非対称因子、 γ : 傾き、 δ : EC_{50} 、 ε : E_{min}) をフィッティングさせた。算出されたパラメータ δ 値、すなわち EC_{50} 値を比活性とした。有意差検定は、Tukey の多重比較検定法を GraphPad Prism Version 5.02 用いて行った。

B.2 先端バイオ医薬品の生物学的試験法に関する研究

B.2.1 細胞および抗体

Fc γ RIIa あるいは Fc γ RIIIa を安定発現する Jurkat 細胞 (以下、各々 Jurkat/ Fc γ RIIa, Jurkat/ Fc γ RIIIa と表記) は RPMI1640 に 10% ウシ胎児血清および Bleocin (終濃度 30 μ g/ml) あるいは G418 (終濃度 1 mg/ml) を添加した培地を用いて培養した。ヒトバーキットリンパ腫細胞株である Daudi 細胞は RPMI1640 に 20% ウシ胎児血清を添加した培地を用いて培養した。

実験に用いた抗体、Adalimumab (Humira[®])、Infliximab (Remicade[®])、Golimumab (Simponi[®]) および Rituximab (Rituxan[®]) は医薬品として販売されているものを購入して使用した。

B.2.2 Fc γ 受容体発現細胞株を用いた Fc・受容体結合能の評価

(1) 蛍光標識二次抗体を用いた結合実験

Jurkat/ Fc γ RIIa (一点あたり 2×10^5 個) を染色バッファー (PBS + 0.5% BSA, 2 mM

EDTA, 0.05% NaN₃) で洗浄後、抗体医薬品を各濃度で添加し 4°C で 30 分間結合させた。細胞を染色バッファーにより洗浄後、FITC 標識した F(ab')₂ anti-human IgG1κ を添加し、さらに 4°C で 30 分間結合させた。その後、染色バッファーを用いて二回洗浄を行い、7-AAD を添加してフローサイトメーターで解析を行った。前方散乱光 (FSC)、側方散乱光 (SSC) および 7-AAD の染色強度によりゲートを指定し、生細胞集団の FITC 蛍光強度の平均値 (Mean Fluorescent Intensity: MFI) を算出した。見かけ上の解離定数 (Kd 値) は GraphPad Prism を用いて、抗体濃度に対して FITC の MFI をプロットし非線形回帰分析により算出した。

(2) 蛍光標識抗体医薬品を用いた結合実験

抗体医薬品の蛍光標識は DyLight488 Antibody Labeling Kit を用いた。蛍光色素の結合量はどれも抗体医薬品 1 分子あたり 4 分子程度となるように調製した。Jurkat/FcγRIIa (一点あたり 2 × 10⁵ 個) を染色バッファーで洗浄後、DyLight488 標識した抗体医薬品を各濃度で添加し 4°C で 30 分間結合させた。染色バッファーで二回洗浄後、フローサイトメーターによる解析を行い、見かけ上の結合親和性を測定した。

(3) 抗原抗体複合体を用いた結合実験

TNFα 組換えタンパク質は QIAgenes Expression Kits を使用して大腸菌により His タグを付加した状態で発現および精製を行った。その後 TAGZyme System により His タグを除去したものを実験に使用した。抗原抗体複合体を形成させるため、DyLight488 標識した Adalimumab と TNFα をモル比 3 : 1 で混合し、37°C で 30 分間反応させた。抗体濃度を基準に希釈系列を調製し Jurkat/FcγRIIa に対する結合をフローサイトメーターにより評価し

た。

B.2.3 Fcγ 受容体発現細胞株を用いた Bridging Assay

標的細胞として Daudi 細胞、エフェクター細胞として Jurkat/FcγRIIIa を使用した。各々の細胞を OPTI-MEM で洗浄後、Daudi 細胞は Calcein AM (終濃度 10 nM) で、Jurkat/FcγRIIIa は Calcein Violet 450 AM (終濃度 1 μM) で 30 分間標識した。OPTI-MEM で 3 回洗浄後、Daudi 細胞 (5 × 10⁴ 個) と Jurkat/FcγRIIIa (5 × 10⁵ 個) を混合し、各濃度の Rituximab 存在下で 37°C、30 分間共培養した。細胞集団の Calcein AM および Calcein Violet 450 AM の蛍光強度をフローサイトメーターにより解析し、single positive および double positive の細胞の割合と各々の集団における平均蛍光強度を算出した。

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

B.3.1 VEGF による HUVEC の増殖促進の阻害を指標とした抗 VEGF 抗体製剤の生物活性の測定 (1) 試薬等の調製

Human Endothelial-SFM 基礎培地にゲンタマイシンを 50 μg/ml、アンフォテリシンを 50 ng/ml、接合因子を 5% 添加し培地を調製した。抗ヒト VEGF 抗体製剤 A 及び B を培地で適当な濃度に希釈し抗 VEGF 抗体サンプルを調製した。組換え VEGF ストック溶液 (10 μg/ml) に培地を加えて 120 ng/ml に希釈し組換え VEGF 溶液を調製した。HUVEC ストック溶液は HUVEC を添付の増殖培地で約 6 継代培養し、2 × 10⁶ 個/ml の溶液を調製し 0.3 ml ずつセラムチューブに分注して -150°C に保存した。

(2) 操作法

抗ヒト VEGF 抗体サンプル 60 μl に等容量の組換え VEGF 溶液を加えて混和後、90 分室温で静置した。混合液をマイクロプレートの各

wellに 50 μ l ずつ添加した。なお、同一濃度の抗 VEGF 抗体サンプルから調製した混合液は 2well ずつ添加した。HUVEC ストック溶液を 37°C の水中で溶かし、培地で遠心洗浄後、 2×10^5 個/ml になるように再懸濁した。細胞懸濁液を 50 μ l ずつ各 well に添加して 2 分間振とうした。4 日間培養後、培地を除去し、Cell counting Kit-8 を 10% 含む培地を各 well に 100 μ l ずつ添加し 3~5 時間培養した。対照波長 650 nm、測定 450 nm で吸光度を測定した。

B.3.2 SPR法を用いたVEGFとの結合能の解析による抗VEGF抗体製剤の生物活性の測定

速度論的解析は BIAcore 3000 を用い、解析はすべて 25°C で行った。ランニング液はすべて 10 mM HEPES buffer pH7.4, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% Surfactant P20 (HBS-EP buffer) を用いた。25 mM NHS / 100 mM EDC 溶液で 7 分間活性化させた CM5 センサーチップに 10 mM acetate buffer pH 6.0 に溶解した組換えヒト VEGF をインジェクトし、3974 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。

抗ヒト VEGF 抗体製剤 A 及び B を、それぞれ 18.75、37.5、75 nM となるように HBS-EP buffer で希釈し、流速 20 μ L/min で 2 分間結合、3 分間解離、1 M citrate-NaOH buffer pH 2.2 で再生した。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(k_a)および解離速度定数(k_d)を求め、平衡定数 KD (k_d/k_a)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事項のうち、特に非臨床試験及び臨床試験での排出試験のあり方と伝播のリスク評価について検討した。

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

日本薬局方については日局 15 および 3 月 24 日告示された日局 16、欧州薬局方は 6.7、米国薬局方は USP34-NF29 について、注射剤の不溶性微粒子試験、製剤均一性試験、崩壊試験、溶出製試験について比較を行い、相違点を整理した。

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

初年度の研究で調査検討した欧州における販売承認の更新制度について、引き続き文献及び web-site 情報に基づき、その実際的な運用状況の調査を行った。また、米国における医薬品の市販後の有効性、安全性の確保のための制度のうち、特に市販後試験の実施及びそのフォローアップに関して調査を行い、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。本研究では市販されているヒト細胞株を用いており、倫理上の問題はない。

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、これまでに多くの遺伝子組換えタンパク質が医薬品として承認されている。これらバイオ医薬品の製造においては、様々な理由により、製法がしばしば変更される。また、近年、既承認薬製造会社とは異なる会社により、異なる製法で製造されるバイオ後続品の開発も活発化している。製法変更やバイオ後続品開発では、ICH Q5E に示されているような参照品との同等性/同質性評価が求められる。

一方、原薬製造においても、体系的に品質を確保することが立証された範囲内での運用であれば、パラメータの変更は製造方法の変更とみなされないデザインスペースの考えが導入されようとしている。デザインスペースの設定には、製品と工程の理解、および基礎となった製品と工程開発研究、並びに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 (PAT) の開発が必要となる。すなわち、バイオ医薬品の製造設計及び工程管理においても、構造や活性の恒常性を確保しうる工程を設定するためには、工程パラメータを変動させたときの構造や活性の変化を迅速かつ詳細に評価しうる PAT の開発が不可欠である。

本分担研究では、バイオ医薬品の特性・品質解析、品質試験法の開発に関する研究の一貫として、バイオ医薬品の同等性/同質性評価、並びに PAT の開発を行っている。昨年度、FSH の実験的製造システムの構築に着手すると

もに、FSH の活性測定法を開発した。本年度は、実験的製造システムを完成させるとともに、無血清化モデル組換えヒト FSH を調製し、糖鎖プロファイルを測定した。さらに、PAT 及び同等性/同質性評価法として利用することを目的に、FSH のレポータージーンアッセイ/SPR イムノアッセイによる比活性測定法を開発し、無血清化による比活性の変動を詳細に比較した。

C.1.1 組換えヒト FSH の作製

FSH のサブユニットは酸性条件で解離してしまうため、中性条件で溶出が可能な抗体として昨年度作製した抗 FSH 抗体 (#3.22) を抗 FSH 抗体カラム作製用として採用した。この抗体は、予備的な検討により、抗 FSH 抗体カラムとして使用したとき、2 M MgCl₂ 溶液で FSH を溶出させることが確認されたものである。しかし、SDS 存在下で安定性が低下し、サブユニットが解離することが確認されたことから、溶出された FSH が少なからず変性している可能性が懸念された。そこで、溶出条件を再検討した結果、2 M アルギニン溶液が変性を引き起こさず、効率的に溶出できることが明らかとなり、以降の溶出液として採用した (図 1)。

培養工程で血清添加培地を用いて製造した FSH (FSH (+)) と無血清培地を用いた FSH (FSH (-)) をそれぞれ 6 ロット製造した。培養状態が安定し、恒常的な製造が行われていると思われたロット 4~6 について以下の解析に供した。ロット 4~6 の各タンパク質濃度は、SPR イムノアッセイによって測定した (表 1, 図 2)。

C.1.2 組換えヒト FSH の糖鎖プロファイル (1) 糖鎖構造解析

FSH(+)及び FSH(-)から N-結合型糖鎖を切り出し、還元化糖鎖とした後、LC/MS 及び

MS/MS~MS/MS/MS/MSにより分析した。各糖鎖の構造は、FT-MSを用いたシングル MS スキャンにより測定された精密質量と MS/MS~MS/MS/MS/MS で検出されたフラグメントイオンの帰属により推定した。図 3A は、FSH (+) 由来還元化糖鎖を分析したときのベースピーククロマトグラムである。ポジティブイオンモードで測定したスペクトルデータを用いて中性糖鎖を解析した結果、16 分にアシアロ複合型 2 本鎖糖鎖 (Hex5HexNAc4)、18 分に 1 分子のフコース (Fuc) が付加したアシアロ複合型 2 本鎖糖鎖 (Fuc1Hex5HexNAc4)、19 分にアシアロ複合型 3 本鎖糖鎖 (Hex6HexNAc5) が溶出されていることが明らかとなった。また、21~30 分に溶出された主要糖鎖は、N-アセチルラクトサミンを有するアシアロ複合型 2~4 本鎖糖鎖 (Hex5HexNAc4Lac1、Fuc1Hex6HexNAc5Lac1、Fuc1Hex7HexNAc6Lac1、Fuc1Hex8HexNAc7Lac1、Fuc1Hex9HexNAc8Lac1、) であると推定された。一方、ネガティブイオンモードで測定したクロマトグラムを用いて酸性糖鎖の解析を行ったが、シアロ糖鎖は検出限界以下であった。

同様に、FSH (-) 由来還元化糖鎖の糖鎖構造解析を行った (図 3B)。中性糖鎖を解析した結果、FSH (+) と比較して、主要糖鎖の種類に違いはみられなかった。また、シアロ糖鎖は検出限界以下であった。

(2) 糖鎖分布

ポジティブイオンモードで検出された糖鎖の総ピーク面積に対する各糖鎖の面積百分率を算出して、FSH (+) 及び FSH (-) の糖鎖分布を比較した (図 4)。その結果、FSH (+) 及び FSH (-) とともに、アシアロ複合型 2 本鎖糖鎖 (Hex5HexNAc4) が全体の 25% を占めていることが明らかとなった。ついで、N-アセチルラクトサミンが付加した Hex5HexNAc4Lac1 及び Fuc1Hex8HexNAc7Lac1

の割合が高かった。両者の糖鎖プロファイルと比較した結果、顕著な差はみられなかった。

(3) PCA

各糖鎖の面積百分率の情報を用いて PCA を行った。図 5 は、第 1 主成分を X 軸、第 2 主成分を Y 軸としたときのスコアプロットである。第 2 主成分により、FSH (+) と FSH (-) が僅かに分離する傾向がみられたが、両者を区別することはできなかった。

これらの結果から、CHO-DG44 細胞を細胞基材として FSH を調製する場合、培養液中の血清の有無は FSH の糖鎖プロファイルに影響を与えないことが示唆された。

現在我が国では、ヒト遺伝子組換え FSH を有効成分とする医薬品として、ホリトロピンアルファとフォリトロピンベータが承認されている。これら FSH の主要糖鎖は、シアル酸が 1~4 分子付加した複合型 2~4 本鎖糖鎖であることが報告されている。先に我々も、ホリトロピンアルファとフォリトロピンベータの糖鎖を LC/MS を用いて解析し、ラクトサミンリピートのないシアル酸結合糖鎖が主な糖鎖であることを確認している。ホリトロピンアルファとフォリトロピンベータはいずれも CHO 細胞由来 FSH であるが、本研究で調製した FSH は CHO 細胞の亜株である CHO-DG44 細胞由来であり、細胞基材の違いにより糖鎖プロファイルが異なること、また、LC/MS を用いた糖鎖プロファイリング法は、その差異を確認できることが示唆された。

C.1.3 組換えヒト FSH の比活性

FSH のレポーター遺伝子アッセイ/SPR イムノアッセイによる比活性測定法により、比活性を詳細に比較した。FSH のレポーター遺伝子アッセイで得られた応答曲線を 5 パラメータロジスティックモデルにフィッティングさせることで EC₅₀ 値を求め、比活性を算出した。

アッセイは、FSH(+)およびFSH(-)の各ロット4~6について2回ずつ行い、血清添加群と無血清群について統計解析を行った結果、無血清培養で比活性が約1.5倍、有意($p < 0.05$)に増加していることが明らかとなった(図6)。なお、ロット間の変動で有意差はなかった。

糖鎖プロファイリングおよび比活性の検討結果から、組換えヒトFSHの培養工程を無血清化することにより、FSHのタンパク質部分の一次構造あるいは高次構造に違いが生じた結果、活性が上昇したものと予想された。また、レポータージーンアッセイ/SPRイムノアッセイによる比活性測定法は、製法変更および製法開発における参照品との同等性/同質性評価法として確立するために、バリデーションを行うことが課題となった。

C.2 先端バイオ医薬品の生物学的試験法に関する研究

抗体医薬品は、モノクローナル抗体作製技術に始まり、各種のライブラリーやトランスジェニック動物を用いたヒト抗体作製技術、組換えタンパク質大量生産技術等、常に先端的な技術の応用により発展してきたバイオ医薬品である。これまでに日米欧で31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、さらに、現在開発中のバイオ医薬品の約3分の1が抗体医薬品類であるとされている¹⁾。最近では特に、抗腫瘍薬あるいは免疫調節薬として、有効性・安全性の向上を目指した改変型抗体医薬品の開発が活発化しており、既存の医薬品では達成されなかった治療効果をもたらす分子標的薬として、抗体医薬品の医療上の重要性は今後も増していくと考えられる。

C.1でも触れたが、近年、ICHの品質分野では、製品の設計を科学的に行い、有効性・安全性に影響する製品の品質特性の許容範囲を明らかにすること、ならびに、製品の品質特性と原

材料・工程パラメータの関連を特定することにより、適切な管理戦略を構築する科学的体系的アプローチ(Quality by Designアプローチ)の重要性が議論されている。Quality by Designアプローチによる品質管理戦略の構築には、製品の品質特性や製造工程に関する十分な理解が必要である。

抗体医薬品の品質確保を考える上では、有効性・安全性に直結する重要品質特性である生物活性の評価系を構築し、生物活性との相関をもとに、構造や物理的・化学的性質に関する品質特性の許容範囲を設定することが合理的であると考えられる。また、製品の生物活性に影響する工程パラメータは、特に重要なパラメータであると考えられることから、工程の評価においても、生物活性評価系を応用することが有用な可能性も考えられる。そこで本分担研究では、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、抗体医薬品の生物活性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構築することを目指している。

抗体医薬品は、抗原結合に関するFab領域と、エフェクター分子の活性化に関与するFc領域からなる多機能分子である。したがって、そ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Fcγ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、サイトカイン等の中和による免疫応答の調節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。このためエフェクター活性を増強あるいは減弱するようなアミノ酸変異等を導入した改変型抗体の開発も盛んに進められており、昨年度はその開発状況およびそれらの

評価に用いられるエフェクター活性測定法の現状と課題について報告した。

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、Fc γ 受容体発現細胞株を用いた抗体医薬品の Fc γ 受容体結合能測定系の有用性について検討した。また ADCC 活性測定のための代替試験の開発に向けて Bridging Assay の有用性について検討を行った。

C.2.1 Fc γ 受容体発現細胞株を用いた Fc γ 受容体結合能の評価

Jurkat/Fc γ RIIIa 細胞に Adalimumab を結合させ、蛍光標識した二次抗体を用いて蛍光強度を指標に結合量を解析した結果、添加濃度に依存した結合の増加が認められた (図 7-A, B)。非線形回帰により求められる Kd 値は約 48 nM であった。次に DyLight488 標識した Adalimumab を用いて同様に結合能を測定した結果、未標識体を用いた場合に比べて結合能は低下し、Kd 値は約 84 nM であった (図 7-C, D)。同程度の蛍光色素を結合させた Infliximab および Golimumab についても Fc γ RIIIa 親和性を測定したところ、各々の Kd 値は~91 nM、~70 nM であった (図 7-E, F)。

抗原抗体複合体を形成した際の抗体医薬品の Fc γ RIIIa 結合能を評価するため、DyLight488 標識した Adalimumab と TNF α をモル比 3 : 1 で混合し Adalimumab-TNF α 複合体を形成させた。Jurkat/Fc γ RIIIa 細胞に対する結合をフローサイトメーターにより測定した結果、結合能の著しい増加が認められた (図 8)。

C.2.2 Fc γ 受容体発現細胞株を用いた Bridging Assay

抗 CD20 抗体である Rituximab による標的細胞とエフェクター細胞の架橋 (bridging) を評価するため、標的細胞として CD20 を高発現するバーキットリンパ腫細胞株である

Daudi 細胞を、モデルエフェクター細胞として Jurkat/Fc γ RIIIa 細胞を用い、各々異なる蛍光色素で標識した。両者を混合しフローサイトメーターを用いて解析した結果、抗体非存在下では、ほぼ両者の単独の細胞のみが観察された (図 9-A, B)。一方、Rituximab (100 μ g/ml) 存在下では両蛍光色素陽性 (double positive) の細胞集団の増加が観察された (図 9-C)。これらの集団は細胞の大きさを反映する前方散乱光 (FSC) が増大しており (図 9-D)、標的細胞とエフェクター細胞が抗体により架橋されたものであると考えられた。表 2 に Rituximab 存在下で培養した際のエフェクター細胞単独 (Jurkat)、標的細胞単独 (Daudi) およびこれらが架橋された細胞 (complex) の割合と各々の平均蛍光強度 (MFI) を示した。標的細胞を標識した Calcein の平均蛍光強度は標的細胞単独 (MFI = 47.92) と架橋された細胞集団 (MFI = 58.45) とで大きな差がないのに対し、エフェクター細胞を標識した Calcein-Violet の平均蛍光強度は架橋された細胞集団 (MFI = 130.89) においてエフェクター細胞単独 (MFI = 72.25) のおよそ 1.8 倍の値を示した。このことから架橋された細胞集団においては一個の標的細胞に対して複数個のエフェクター細胞が結合している可能性が考えられた。Rituximab による標的細胞とエフェクター細胞の架橋能を定量的に示すため、標的細胞のうちエフェクター細胞と架橋された細胞の割合を指標 (Bridging Index) とした。Rituximab 濃度を変化させてアッセイを行った結果、抗体濃度の増加に伴って架橋された標的細胞の割合の増加が認められた (図 10)。

C.2.3 抗体医薬品の生物活性評価法に関する考察

近年のバイオ医薬品開発の大部分を占める抗体医薬品の中でも特に抗腫瘍活性を有する品目の割合は多い。これらの多くが ADCC 活

性等のエフェクター活性を主要な作用メカニズムの一つとしており、天然型の IgG 骨格のみならず、Fc 領域のアミノ酸置換や糖鎖構造の改変等により Fc γ 受容体との結合親和性を変化させることで ADCC 活性の増強を狙った改変型抗体の開発が進んでいる。一方、中和活性やアゴニスト活性を作用メカニズムとする抗体では、予期せぬ免疫反応を抑制する目的でエフェクター活性の減弱を狙った改変体の開発も進められている。

これらの改変型抗体医薬品では、エフェクター分子の活性化能が、管理すべき重要品質特性の一つとなると考えられる。そのため、改変により変化の生じる Fc γ 受容体との結合親和性およびエフェクター活性について十分な特性解析を行うと共に、多くの場合、規格及び試験方法においてそれらを反映した力価試験を設けることが必要と考えられる²⁾。また、製造工程の開発において、製品の品質特性に影響する重要な工程パラメータを特定する際に、エフェクター活性への影響を考える必要があると考えられる。

現在汎用されているエフェクター活性測定法では、エフェクター細胞としてヒト末梢血単核球細胞が用いられる。しかし、この場合、ドナーやロットの違いによる再現性等の問題が存在するため、品質試験としての適用は難しく、また、工程パラメータの解析に用いることは現実的ではない。そのため、より頑健性の高い代替試験法の開発が進められている。その一例として Fc γ 受容体結合能の評価系があげられる。抗体医薬品の Fc γ 受容体結合能の変化は ADCC 活性と相関することから、抗原結合能と合わせて評価することで抗体医薬品の ADCC 活性を担保しようとするものである。測定系としては Fc γ 受容体の細胞外ドメインの組換えタンパク質を固相化した ELISA や SPR 法が用いられることが多い。これらの方法は、生細胞を用いないことから試験法のバリ

デーションが比較的容易であり、再現性の良いデータを取得可能であるという利点をもつ一方で、多量の精製タンパク質を必要とすること、条件によっては必ずしも細胞表面における事象を反映しないなどの問題点も存在する。Fc γ 受容体は糖タンパク質でありその糖鎖修飾が抗体との結合に影響することが知られているほか³⁾、細胞膜上で多量体化して働く Fc γ 受容体との結合は単量体の組換えタンパク質を用いた実験では正しく評価できない例も報告されている⁴⁾。

そこで本研究では Fc γ 受容体を恒常的に発現する培養細胞株を用いた cell-based の結合実験の有用性について検討を行った。抗 TNF α 抗体である Adalimumab および二次抗体として蛍光標識した抗ヒト IgG 抗体を用いて Fc γ RIIIa に対する結合実験を行った結果、添加濃度に依存した結合量の増加が認められ、その Kd 値は約 48 nM であった。Fc γ RIIIa に対する IgG1 の Kd 値は SPR 法を用いた多くの論文で数百 nM と報告されており^{5,6)}、cell-based の結合実験では見かけ上、より強い親和性を示すことが明らかとなった。また、測定系の簡便化のため Adalimumab を直接蛍光標識した場合には標識の影響で結合親和性の低下が観察された(図 7-D)ものの、同様の手法で蛍光標識を導入した Infliximab および Golimumab (共に IgG1 骨格を持つ抗 TNF 抗体)でも同程度の結合親和性が認められた(図 7-E, F)。蛍光標識に限らず抗体の化学標識による活性の低下や不均一性の増大は不可避な問題ではあるが、比較試料を同様の条件で標識するなどの工夫によりその影響を最小限に抑えることが重要であると考えられた。

抗体医薬品の結合解析に汎用される SPR 法はリガンド・アナライトの結合をリアルタイムでモニター可能であり結合速度及び解離速度を含めた結合親和性の評価に強みを有する一方で、免疫複合体のように不均一で結合部位の

複数存在するような試料の測定は困難である。図 8 に示したように、cell-based の結合実験ではこのような免疫複合体を形成した抗体医薬品の Fc γ 受容体親和性を簡便に評価できることも特徴である。以上のように cell-based の結合実験は簡便性、迅速性およびコスト面のみならず、より生体内に近い環境で結合を評価可能であるという利点を有しており、抗体医薬品の Fc γ 受容体親和性の評価において有用な選択肢の一つであるといえる。また Fc γ 受容体発現細胞を用いた実験では抗体医薬品の結合のみならず、それに伴う細胞内シグナル活性化の評価も可能である。サイトカイン等の可溶性タンパク質を標的とし ADCC 活性を示さない抗体医薬品においても、免疫複合体の形成とその Fc γ 受容体への結合およびシグナル活性化は、食食による抗体の分解や免疫細胞の介在するインフュージョン反応の発生にも関与する特性であり、Fc γ 受容体発現細胞を用いたアッセイ系はこれらの評価においても有用であると考えられる。

抗原に結合していない IgG は、ADCC 活性の発揮に主要な役割を果たす Fc γ RIIa (CD32) および Fc γ RIIIa (CD16) に対する親和性が低く、抗原タンパク質と結合することではじめて強い結合能を示す。また、標的細胞における抗原の発現量 (抗原密度) や抗原認識部位の違いが抗体医薬品の ADCC 活性に影響することが知られている。このため ADCC 活性の評価においては、生理的条件下に近い状態で抗原と結合した抗体医薬品の活性 (Fc γ 受容体結合・活性化能) をモニターすることが重要となるが、上で述べたような結合実験では標的細胞膜上に局在する抗原タンパク質と結合した抗体の機能を評価することは困難である。そこで次に、細胞膜上に発現する抗原に対する抗体医薬品の結合とそれに追従する Fc γ 受容体への結合を同時に評価可能な実験系として、Bridging Assay の有用性について検討を行った。

標的細胞として Daudi 細胞を、エフェクター細胞として Jurkat/FcR γ IIIa を各々異なる蛍光色素で標識し、抗 CD20 抗体である Rituximab 存在下で共培養したところ、両細胞が架橋された集団の割合の増加が認められた (図 9)。標的細胞のうちエフェクター細胞と架橋された割合を Bridging Index として添加抗体濃度に対してプロットするとシグモイド型の反応曲線を示し (図 10)、4 パラメータロジスティックモデルを適用することで EC50 はおよそ 0.2 μ g/ml と算出された。抗体医薬品の ADCC 活性の EC50 は標的細胞の種類、エフェクター細胞に発現する Fc γ 受容体の遺伝子多型、標的細胞とエフェクター細胞の混合比などにより変動するため、今回の Bridging Assay で示された値の妥当性については一概には判断できない。しかしながら予備的な実験により、Fc γ 受容体結合能が亢進したより強い ADCC 活性を発揮する抗体を用いた場合には Bridging Assay における EC50 値が低下 (Bridging 活性が増大) するという結果を得ており、ADCC 活性の代替試験法として有用である可能性を見出している。今後は他の抗体や劣化試料等を用いた実験を行い、抗原・Fc γ 受容体結合能および ADCC 活性の変動との比較を行うことで、ADCC 活性の代替試験法としての Bridging Assay の有用性について更なる検討を進める予定である。

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

C.1 でも述べたように、組換え DNA 技術を応用したタンパク質性医薬品は 1980 年代に始めて承認されて以来、数多くの製品が開発・承認されており、現在、これらのタンパク質性医薬品は特許切れを迎えることとなり、バイオ後発品の開発が活発に行われつつある。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。

タンパク質性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の同等性評価が重要となる。したがって、臨床試験を行う前に、同等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との同等/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、バイオ後続品の同等/同質性評価は、構造に関する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る。

そこで、本分担研究では結腸・直腸癌及び中心窩下脈絡幕新生血管を伴う加齢黄斑変性の治療に用いられている抗ヒト VEGF 抗体製剤 2 種類 (A 及び B) を例として、製造方法の違い (異なる細胞での製造) が生物活性に及ぼす影響について、VEGF による HUVEC の増殖促進に対する阻害を指標とするアッセイ及び SPR 法を用いた VEGF への結合能解析により検討を行った。

C.3.1 VEGF による HUVEC の増殖促進の阻害を指標とした抗ヒト VEGF 抗体製剤の生物活性

大腸菌及び CHO 細胞で発現させ精製した組換え抗ヒト VEGF 抗体製剤 A 及び B について、VEGF による HUVEC の増殖促進に対する阻害を指標としてアッセイを行った結果、1.4 nM までの比較的狭い濃度範囲で良好な阻害曲線が得られた (図 11)。データは示していないが二連における誤差は 10%以内と値のばらつきは少なかった。なお、増殖の 50%阻害に要する抗ヒト VEGF 抗体製剤 A 及び B の濃度はそれぞれ 0.504 nM 及び 0.617 nM であった。一方、抗ヒト VEGF 抗体製剤 A では 0.78 nM 以上では阻害の程度にほとんど変化がみられないのに対し、

抗ヒト VEGF 抗体製剤 B では濃度が高いほど強い阻害が認められた。

C.3.2 SPR 法を用いた VEGF との結合能の解析による抗ヒト VEGF 抗体製剤の生物活性

抗ヒト VEGF 抗体製剤 A 及び B のセンサーグラムを示す (図 12)。両者において VEGF に対する平衡定数 (KD) は抗ヒト VEGF 抗体製剤 A 及び B でそれぞれ 26.3 pM 及び 400 pM であった (表 1)。

C.3.3 抗ヒト VEGF 抗体製剤の製造方法と生物活性の評価に関する考察

VEGF による HUVEC 細胞増殖の 50%阻害に要する濃度は抗ヒト VEGF 抗体製剤 A 及び B とも約 0.5~0.6 nM でほぼ同等であったが、0.78 nM 以上の阻害様式が異なっていた。通常、抑制作用を示す抗体医薬品では 50%阻害濃度により生物活性が評価される。しかし、今回のように両者で阻害率の最大値が異なることが予想される場合、生物活性の比較評価は 50%阻害濃度の比較のみで十分であるかどうか今後の検討課題として提起された。

一方、SPR 法を用いた VEGF に対する結合能により生物活性を評価した場合、上記増殖阻害アッセイの結果と異なり、両者で約 15 倍もの活性の違いが観察された。したがって、少なくとも今回用いた SPR 法の測定条件では、両者の生物活性を増殖アッセイに替わって比較することは困難であることが明らかになった。

SPR 法での結果が増殖アッセイと異なる結果となった原因のひとつとして、抗原と抗体の複合体が解離しにくいことが挙げられる。すなわち、極めてゆっくりした解離から解離速度定数 (kd 値) を予測する必要があるため、ばらつきが大きくなり、結果的に平衡定数 (KD 値) に顕著な差が生じた可能性が考えられる。したがって、SPR 法での高親和性の分子間相互作用解析における原理的なハードルが原因であり、

注意が必要である。なお、増殖因子とそのレセプターのように結合定数が高くないケースでは、通常の解析法で安定した測定が可能であるため、SPRは有効な手法である。SPR法は操作が簡単で平衡定数を正確にかつ高精度で測定できハイスループットであることから抗体医薬品の生物活性測定法への応用が期待されている。しかしながら、本研究結果は、親和性の高い抗体医薬品の活性評価に SPR 法を用いる場合、適切であるか十分に留意する必要がある。高親和性を原因とした不適例の解決方法の開発は、今後の課題であるが、測定条件等を十分に検討することで、適用可能となることが期待される。具体的な改善方法として、抗原・抗体複合体の解離を促進させる界面活性剤の添加、あるいは反応温度を高めることなどが考えられる。ただし、採用した測定条件での評価結果が生物活性を反映しているか、細胞を用いた生物活性の測定結果と慎重に比較検討することが必要であろう。

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

遺伝子治療薬の排出 (shedding) とは、遺伝子治療用ベクターや腫瘍溶解性ウイルス、細菌などを投与した患者から、ベクターやウイルス、細菌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、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。

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、非臨床試験から臨床試験においてどのような排出の評価を行う

べきかについては必ずしも明確にされてこなかった。そこで、ICH では 2009 年に「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」を発出し、第三者への伝播のリスクを把握するための非臨床試験や臨床試験での排出の評価に関する基本的な考え方を示した。しかし、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。そこで、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 ICH 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。ガイドラインの目的は、非臨床、臨床試験での排出試験計画、排出の検出および特性解析法に関するガイダンスを提示することである。排出の評価により排出の起こりやすさ、第三者への伝播や公衆衛生上の問題点について推定することが可能となる。ガイドラインが作成されれば、排出試験の実施に関して国際調和が推進され、不要な試験を避けることが可能となる。また、開発段階での排出に関するデータが蓄積されれば、市販後の製品の安全性監視にも役立つことが期待される。

本分担研究では、昨年度に引き続き、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やベクターの排出の評価法に関して、今後、国際調和ガイドラインに盛り込むべき要件を検討した。昨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を行ったが、今年度は非臨床試験及び臨床試験での排出試験のあり方と伝播のリスク評価について検討した。

C.4.1 非臨床での排出試験

非臨床での排出試験はウイルスやベクターの分泌・排泄プロファイルを明らかにすることを目的とするもので、実施が望ましいが、当該ベクター/ウイルス系に関して十分な経験

がある場合には、その価値は限定的と考えられる。非臨床での排出試験データは、臨床での排出の可能性と程度を推定し排出試験を計画するのに役立つが、臨床の排出試験を代替するものではない。また非臨床の排出試験は独立した試験として実施する必要はなく、他の非臨床試験に組み込むことが可能である。同じウイルス株や同じウイルス/ベクターでマーカー遺伝子を発現するものなど、同様の性質を示すウイルス/ベクター製品を用いた試験結果を排出プロファイルの推定に用いることができると考えられるが、非臨床での排出試験を実施しない場合は、その妥当性を示す必要がある。排出は生体内分布とは異なるが、非臨床での生体内分布試験データは排出試験を計画するのに役立つと考えられる。

(1) 非臨床排出試験に使用する製品

非臨床での排出試験に用いる製品は、臨床試験で用いる製品と同等のもの、特に分子的・遺伝的に同一で、ウイルスのタイター/活性、処方も同等であることが必要である。臨床用の製品と可能な限り同様の製造が必要とされるが、臨床用より小スケールでの製造でよく、試験もすべて実施する必要はないと考えられる。排出試験に用いる非臨床製品の品質に関する適切な評価、及び非臨床用と臨床用の品質特性の詳細な比較については、臨床試験の開始までに得ておく必要がある。

(2) 動物種

ウイルス/ベクター製品の多くの動物種の感染性については、由来する親株の性質に依存し、ヒト以外の動物種では容易に感染しない場合が多いため、非臨床での排出試験を実施する前に、選択した試験動物への感染性を確認することが重要である。さらに、動物によっては、ウイルス受容体の発現と分布が宿主への取り込

みと排出プロファイルに影響する可能性があり、ウイルス/ベクターの細胞・組織分布は種により異なる可能性がある。排出試験での生物学的に妥当な種の選択の原則は、人と同じウイルス/ベクター感染性、増殖性を示す非病態動物である。ウイルス/ベクターの生物活性や毒性、生体内分布が疾患の状態により異なる可能性があるため、疾患モデル動物を使用することが望ましい。動物種/モデルの選択の妥当性を示すため、正常な種と病態モデルでの排出の比較を示す必要がある。一つの方法としては選択した動物種・モデルの妥当性を示すデータを含む非臨床 POC、毒性・生体内分布試験での知見を基に、ウイルス排出の試験を計画するという方法がある。疾患の状態が排出プロファイルに影響することが予想される場合、疾患状態を模倣した動物モデルを試験に用いるべきである。例えば、腫瘍溶解性ウイルスでは、ウイルスを増殖させるため担癌モデルの使用が適している。また担癌状態はウイルス/ベクターに対する免疫能に影響する可能性があり、ウイルス/ベクターの拡散とクリアランス速度、ひいては排出に影響する可能性がある。

疾患モデル動物を用いた排出試験は動物の作製やケアに特殊な技術を持つラボで実施する必要があるが、GLP の遵守は困難である。この場合、各試験の詳細なプロトコールをあらかじめ設計しておく必要があり、プロトコールに従って実施すべきである。データの整合性を確保すべきであり、プロトコールの逸脱については記録しておく必要がある。

(3) 投与量と投与経路

非臨床での排出試験における投与量と投与経路は、可能な限り臨床で予定されている投与量、投与経路を反映すべきであり、1) 臨床での投与経路の使用、2) 少なくとも臨床での投与量増大試験での最大投与量の投与、2) 単回投与か繰り返し投与かを含む臨床で予定され

る投与計画、での実施が求められる。さらに、臨床投与量の範囲内でウイルス/ベクター排出の投与量依存性の影響を評価することを考慮するのもよい。臨床での投与経路に加え、全身性投与における排出プロファイルを調べるために静脈内 (IV) 投与を行うことも考えられるが、静脈内投与は暴露に関して最悪のケースとは限らない。例えば、頭蓋内投与でウイルスの感染・増殖が局所でおこる場合、局所での活性が排出プロファイルに影響する可能性があるが、これは静脈内投与では反映されない。従って、静脈内投与を排出の評価の規定値として用いる場合には、その妥当性を示す必要がある。

(4) サンプリングの頻度と試験期間

ウイルス/ベクター投与後のサンプリング頻度の決定に、野生型株の既知の生物学的特性を利用することができる。一般に、投与後最初の数日間は、一過性の排出プロファイルを検出するために、より高い頻度でサンプルを採取することが適切である。排泄物・分泌物の量が限られることから、サンプルの数と頻度は現実性を考慮して決定すべきである。単回投与後の排出プロファイルをまず調べ、そのデータを複数回投与でのサンプリング頻度の決定に用いることができる。

体内分布試験の結果はウイルス/ベクターの組織中での持続性評価に有用と考えられる。ウイルス/ベクターが腎臓、肺、血中など特定の組織で長期間持続する場合、排出の分析期間は数値の低下が認められる同様のタイムコースで実施することが望ましい。生体内分布期間より長く排出が持続する場合、排出を検出する適切な期間での試験の実施が必要である。増殖性ウイルス/ベクターの場合、増殖を示唆する第2のピークの検出に十分な試験期間をとることが重要である。複数の連続する試料が陰性となれば、排出試験を終了してよいと考えられる。排出試験には感度の高い定量的アッセイ法を

用いること、またアッセイ効率は低濃度のウイルス/ベクターを十分正確に測定できることが重要である。

潜伏感染、再活性化するウイルス/ベクター製品 (細菌を含む) では、動物モデルで人と同様に潜伏感染や再活性化を見ることは難しい。

また、免疫応答はウイルス/ベクターを血中から除去し排出の期間を短縮化する可能性があるため、データの解釈で考慮する必要がある。

現在実施されている細菌療法には、各治療サイクルの後で抗生物質投与により細菌感染のクリアランスが行われるというものがある。これは非臨床試験で評価すべきであり、短期間 (2,3ヶ月まで) の効果は動物モデルで容易に評価可能と考えられる。抗生物質治療を繰り返すことによる選択圧力は、投与した細菌の「遺伝的ドリフト」を誘導し、生物学的特性や排出パターンの変化を導く可能性があると考えられる。

(5) サンプルの採取

採取するサンプルは、ウイルス/ベクターの特性、投与経路及び動物種、生体内分布プロファイルを考慮して決定すべきである。最も一般的に採取されるサンプルの例は尿と糞便であるが、ほかに口腔スワブ (ぬぐい液)、鼻腔スワブ、唾液、気管支洗浄液などのサンプルを含めることもできる。

定量的で適格性が確認された分析試験を実施するためには、採取するサンプルの種類と採取量を考慮することが重要である。尿のように、分泌物・排泄物の種類によっては十分量のサンプルを採取することが困難な場合、十分なサンプル量を得るために同一量を同時に投与された複数の動物から得られるサンプルをプールすることが選択肢のひとつと考えられる。投与群あたりで必要となるサンプルと採取の間隔、