

図5 PCAによるFSH(+)とFSH(-)の区別

FSH(+), 血清添加培地で培養したDG44細胞から産生されたFSH  
 FSH(-), 無血清培地で培養したDG44細胞から産生されたFSH (n=4)

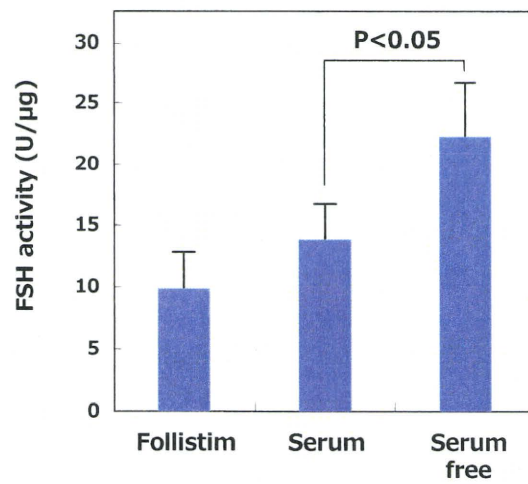


図6 組換えヒトFSHの比活性の比較

先端バイオ医薬品の生物学的試験法に関する研究

研究分担者 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  
研究協力者 多田 稔 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 研究員

代表的な先端バイオ医薬品である抗体医薬品の生物活性測定法の中でも、近年の製品開発動向を踏まえて特に重要と考えられる Fc 領域の機能性評価法に関して、有用性と技術的課題に関する検討を行った。まず、Fc $\gamma$ 受容体発現細胞株を用いた Cell-based Binding Assay を構築して、抗 TNF $\alpha$  抗体を用いたモデル実験を行い、Fc $\gamma$ 受容体結合親和性の測定、及び、抗原結合に依存した Fc $\gamma$  受容体結合親和性の変化の検出が可能であることから、本法が品質特性解析法として適用可能であることを示した。次に、抗原発現細胞と Fc $\gamma$ 受容体発現細胞株を用いた Bridging Assay を構築して、抗 CD20 抗体を用いたモデル実験を行い、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 Bridging Index とすることで、抗体医薬品の抗原結合能と Fc $\gamma$  受容体結合能を評価できることを示した。Bridging Assay は、頑健性の高い試験法確立が困難とされる抗体依存性細胞傷害（ADCC）活性の代替試験法として適用できる可能性があると考えられた。

#### A. 研究目的

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。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。

近年、日米 EU 医薬品規制調和国際会議（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す。

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 Fc $\gamma$  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 $\gamma$ 受容体発現細胞株を用いた抗体医薬品の Fc $\gamma$ 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。

## B. 研究方法

### B.1 細胞および抗体

Fc $\gamma$ RIIIa あるいは Fc $\gamma$ RIIIa を安定発現する Jurkat 細胞 (以下、各々 Jurkat/ Fc $\gamma$ RIIIa, Jurkat/ Fc $\gamma$ RIIIa と表記) は RPMI1640 (Invitrogen) にウシ胎児血清 (ニチレイ、終濃度 10%) および Bleocin (Merck、終濃度 30  $\mu$ g/ml) あるいは G418 (ナカライテスク、終濃度 1 mg/ml) を添加した培地を用い、37 $^{\circ}$ C、5% CO $_2$ 条件下で培養した。ヒトパーキットリンパ腫細胞株である Daudi 細胞は RPMI1640 に終濃度 20% でウシ胎児血清を添加した培地を用いて同様の条件で培養した。

実験に用いた抗体、Adalimumab (Humira $^{\circledR}$ , Abbott)、Infliximab (Remicade $^{\circledR}$ , Centocor)、Golimumab (Simponi $^{\circledR}$ , Centocor) および Rituximab (Rituxan $^{\circledR}$ , Biogen Idec/Genentech) 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 Fc $\gamma$ 受容体発現細胞株を用いた Fc $\gamma$ 受容体結合能の評価

#### B.2.1 蛍光標識二次抗体を用いた結合実験

Jurkat/ Fc $\gamma$ RIIIa (一点あたり  $2 \times 10^5$  個) を染色バッファー (PBS + 0.5% BSA, 2 mM EDTA, 0.05% NaN $_3$ ) で洗浄した後、抗体医薬品を各濃度で添加し 4 $^{\circ}$ 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した後、FITC 標識した F(ab') $_2$  anti-human IgG1 $\kappa$  (Jackson ImmunoResearch) を添加し、さらに 4 $^{\circ}$ 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 (BD) を添加してフローサイトメーター (BD, FACSCantoII) 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 (K $_d$  値) は GraphPad Prism (GraphPad Software) 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。

#### B.2.2 蛍光標識した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 (PIERCE) を用いて添付文書に従って行った。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/ Fc $\gamma$ RIIIa (一点あたり  $2 \times 10^5$  個) を染色バッファーで洗浄した後、DyLight488 標識した抗体医薬品を各濃度で添加し 4 $^{\circ}$ C で 30 分間結合させた。染色バッファーで二回洗浄を行った後、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。

#### B.2.3 抗原抗体複合体を用いた結合実験

TNF $\alpha$  組換えタンパク質は QIAGENes Expression Kits (QIAGEN) 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

(QIAGEN)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 TNF $\alpha$  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/Fc $\gamma$ RIIIa に対する結合をフローサイトメトリーにより評価した。

### B.3 Fc $\gamma$ 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/Fc $\gamma$ RIIIa を使用した。各々の細胞を OPTI-MEM (Invitrogen) で洗浄した後、Daudi 細胞は Calcein AM (eBiosciences、終濃度 10 nM) で、Jurkat/Fc $\gamma$ RIIIa は Calcein Violet 450 AM (eBiosciences、終濃度 1  $\mu$ M) で 30 分間標識した。OPTI-MEM で 3 回洗浄した後、Daudi 細胞 (5 x 10<sup>4</sup> 個) と Jurkat/Fc $\gamma$ RIIIa (5 x 10<sup>5</sup> 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。

(倫理面への配慮)

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

### C.1. Fc $\gamma$ 受容体発現細胞株を用いた Fc $\gamma$ 受容体結合能の評価

Jurkat/Fc $\gamma$ 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 1-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 1-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 $\gamma$ 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 1-E, F)。

抗原抗体複合体を形成した際の抗体医薬品の Fc $\gamma$ RIIIa 結合能を評価するため、DyLight488 標識した Adalimumab と TNF $\alpha$  をモル比 3 : 1 で混合し Adalimumab-TNF $\alpha$  複合体を形成させた。Jurkat/Fc $\gamma$ 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 2)。

### C.2. Fc $\gamma$ 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 $\gamma$ 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 3-A, B)。一方、Rituximab (100  $\mu$ 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 3-C)。これらの集団は細胞の大きさを反映する前方散乱光が増大しており (図 3-4)、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 1 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 4)。

#### D. 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 $\gamma$ 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 $\gamma$ 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<sup>2)</sup>。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が開発が進められている。その一例として Fc $\gamma$ 受容体結合能の評価系があげられる。抗体医薬品の Fc $\gamma$ 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 $\gamma$ 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 や表面プラスモン共鳴法 (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 $\gamma$ 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<sup>3)</sup>、細胞膜上で多量体化して働く Fc $\gamma$ 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<sup>4)</sup>。

そこで本研究では Fc $\gamma$ 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 $\alpha$ 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 $\gamma$ RIIa に対する結合実験を行った結果、図 1-B に示すように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 $\gamma$ RIIa 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<sup>5,6)</sup>、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 1-D) もの、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 1-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2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 $\gamma$ 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 $\gamma$ 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 $\gamma$ 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 $\gamma$ 受容体への結合およびシグナル活性化は、貪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しうる特性であり、Fc $\gamma$ 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 $\gamma$ RIIIa (CD32) およびFc $\gamma$ 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、生理的条件に近い状態で抗原と結合した抗体医薬品の活性（Fc $\gamma$ 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の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 $\gamma$ 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 $\gamma$ 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3）。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4）、4パラメータロジスティックモデルを適応することでEC50（50%効果濃度）はおよそ0.2  $\mu$ 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 $\gamma$ 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 $\gamma$ 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（データ未掲載）、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 $\gamma$ 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。

## E. 結論

抗体医薬品の生物活性のうちFc領域の機能性評価法に着目し、フローサイトメーターを利用した下記試験法を構築して、その有用性を明らかにした。

### 1) Fc $\gamma$ 受容体発現細胞株を用いた Cell-based Binding Assay :

抗TNF $\alpha$ 抗体を用いたモデル実験を行い、Fc $\gamma$ 受容体結合親和性の測定、及び、抗原結合に依存したFc $\gamma$ 受容体結合親和性の変化の検出が可能であることから、本法が品質特性解析法として適用可能であることを示した。

### 2) 抗原発現細胞及び Fc $\gamma$ 受容体発現細胞株を用いた Bridging Assay

抗CD20抗体を用いたモデル実験を行い、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 bridging index とすることで、抗体医薬品の抗原結合能と Fc $\gamma$ 受容体結合能を評価できることを示した。Cell bridging assay は、頑健性の高い試験法確立が困難とされる ADCC 活性の代替試験法として適用できる可能性があると考えられた。

#### F. 参考文献

- 1) McCamish, M., and G. Woollett. 2011. Worldwide experience with biosimilar development. *MAbs* 3:209-217.
- 2) Shapiro, M. A. 2010. Regulatory Perspectives and Expectations of Fc Effector Function Assessment. In *AAPS National Biotechnology Conference*.
- 3) Shibata-Koyama, M., S. Iida, A. Okazaki, K. Mori, K. Kitajima-Miyama, S. Saitou, S. Kakita, Y. Kanda, K. Shitara, K. Kato, and M. Satoh. 2009. The N-linked oligosaccharide at Fc gamma RIIIa Asn-45: an inhibitory element for high Fc gamma RIIIa binding affinity to IgG glycoforms lacking core fucosylation. *Glycobiology* 19:126-134.
- 4) Shashidharamurthy, R., F. Zhang, A. Amano, A. Kamat, R. Panchanathan, D. Ezekwudo, C. Zhu, and P. Selvaraj. 2009. Dynamics of the interaction of human IgG subtype immune complexes with cells expressing R and H allelic forms of a low-affinity Fc gamma receptor CD32A. *J Immunol* 183:8216-8224.
- 5) Bruhns, P., B. Iannascoli, P. England, D. A. Mancardi, N. Fernandez, S. Jorieux, and M. Daeron. 2009. Specificity and affinity of human Fc gamma receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood* 113:3716-3725.
- 6) Richards, J. O., S. Karki, G. A. Lazar, H. Chen, W. Dang, and J. R. Desjarlais. 2008. Optimization of antibody binding to Fc gamma RIIIa enhances macrophage phagocytosis of tumor cells. *Mol Cancer*

*Ther* 7:2517-2527.

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表、総説

- 1) Akiko Ishii-Watabe, Yoshiro Saito, Takuo Suzuki, Minoru Tada, Maho Ukaji, Keiko Maekawa, Kouichi Kurose, Nahoko Kaniwa, Jun-ichi Sawada, Nana Kawasaki, Teruhide Yamaguchi, Takako Eguchi Nakajima, Ken Kato, Yasuhide Yamada, Yasuhiro Shimada, Teruhiko Yoshida, Takashi Ura, Miyuki Saito, Kei Muro, Toshihiko Doi, Nozomu Fuse, Takayuki Yoshino, Atsushi Ohtsu, Nagahiro Saijo, Tetsuya Hamaguchi, Haruhiro Okuda, Yasuhiro Matsumura: Genetic polymorphisms of *FCGRT* encoding FcRn in a Japanese population and their functional analysis. *Drug Metab. Pharmacokine* 25(6), 578-587 (2010)
- 2) 石井明子、鈴木琢雄、多田 稔、川西 徹、山口照英、川崎ナナ: 抗体医薬品の体内動態制御に関わる受容体: FcRn 日本薬理学会誌 136(5), 280-4 (2010)
- 3) 石井明子、川崎ナナ: バイオ治験薬の品質安全性確保 ファームテクジャパン 16, 69-80 (2010)

##### 2. 学会発表

- 1) 多田稔、石井明子、鈴木琢雄、斎藤嘉朗、川崎ナナ: FCGRT 遺伝子多型解析により見出された Neonatal Fc receptor (FcRn) 変異体の機能解析」 BMB2010 (第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会) 2010年12月
- 2) 多田稔、石井明子、鈴木琢雄、豊田淑江、川崎ナナ: 複合体形成能に着目した抗 TNF $\alpha$  抗体医薬品の生物活性評価に関する研究 日本薬学会第131年会 2010年3月 静岡

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

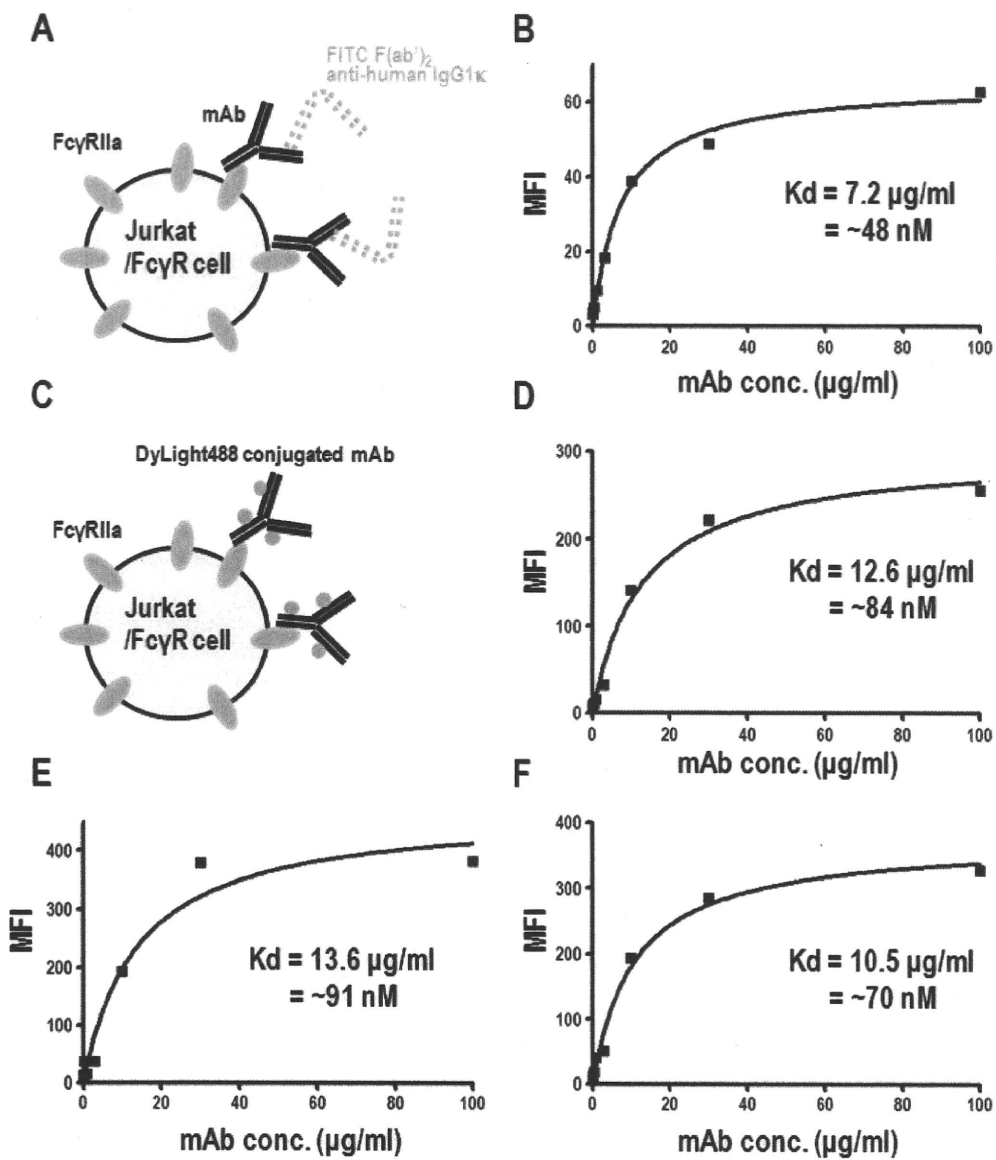


図1 Fcγ受容体発現細胞株を用いた cell-based の結合実験

A: 蛍光標識二次抗体を用いた結合実験の模式図

B: Jurkat/FcγRIIa に対する Adalimumab および FITC 標識二次抗体を用いた結合実験

C: DyLight488 標識抗体医薬品を用いた結合実験の模式図

D: Jurkat/FcγRIIa に対する DyLight488 標識 Adalimumab の結合実験

E: Jurkat/FcγRIIa に対する DyLight488 標識 Infliximab の結合実験

F: Jurkat/FcγRIIa に対する DyLight488 標識 Golimumab の結合実験



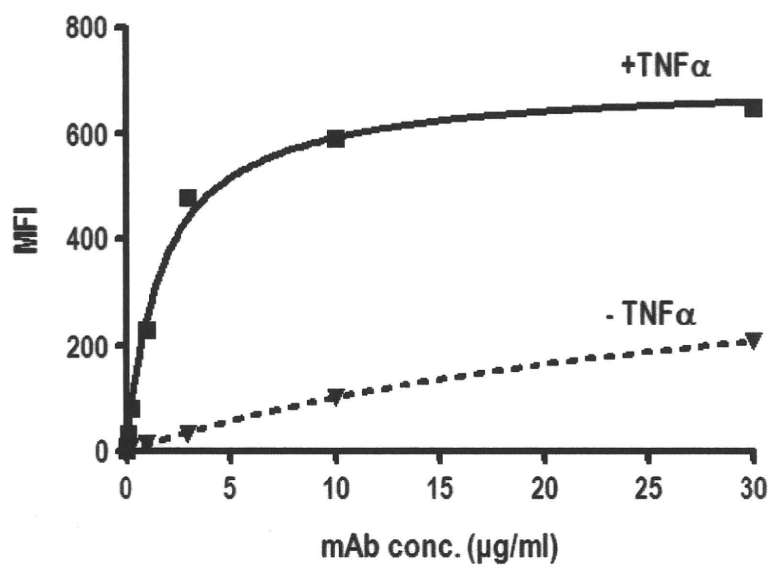


図2 Jurkat/FcγRIIIa に対する TNFα-Adalimumab 複合体の結合

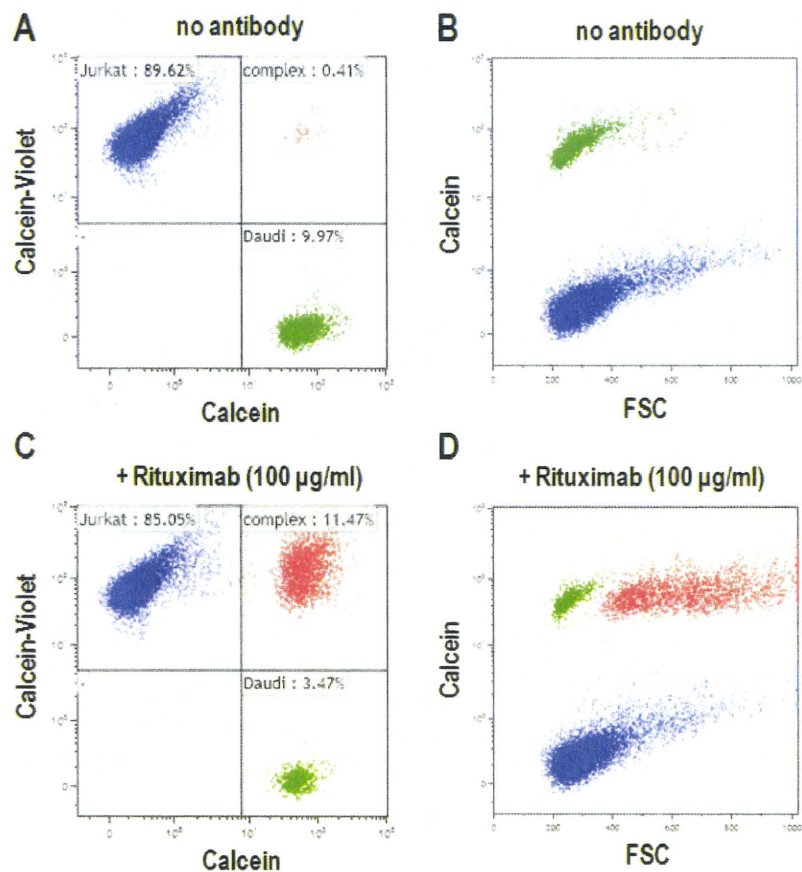


図3 RituximabによるDaudi細胞とJurkat/FcγRIIIa細胞の架橋  
 Rituximab非存在下(A,B)および存在下(C,D)における細胞集団の蛍光強度の  
 ドットプロット。標的細胞(Daudi)単独を緑色、エフェクター細胞(Jurkat/FcγRIIIa)  
 単独を青色、両者が架橋されたもの(complex)を赤色で示した。

	% of total	Calcein MFI	Calcein-Violet MFI
Jurkat	85.05	0.29	72.25
Daudi	3.47	47.92	0.07
Complex	11.47	58.45	130.89

表1 各細胞集団の割合と平均蛍光強度(MFI)

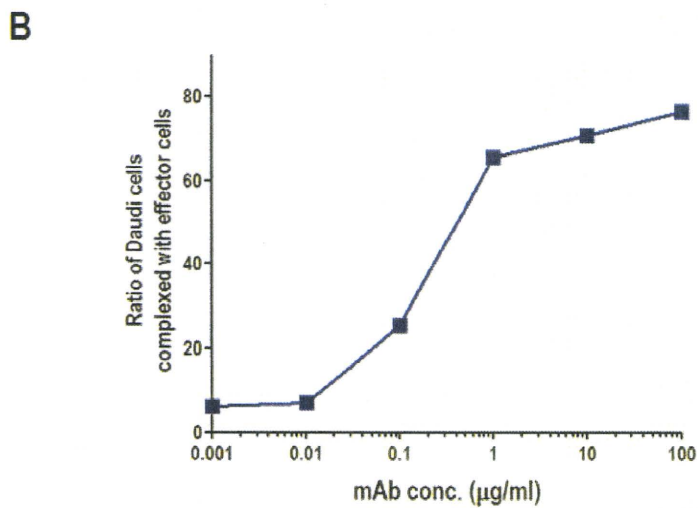
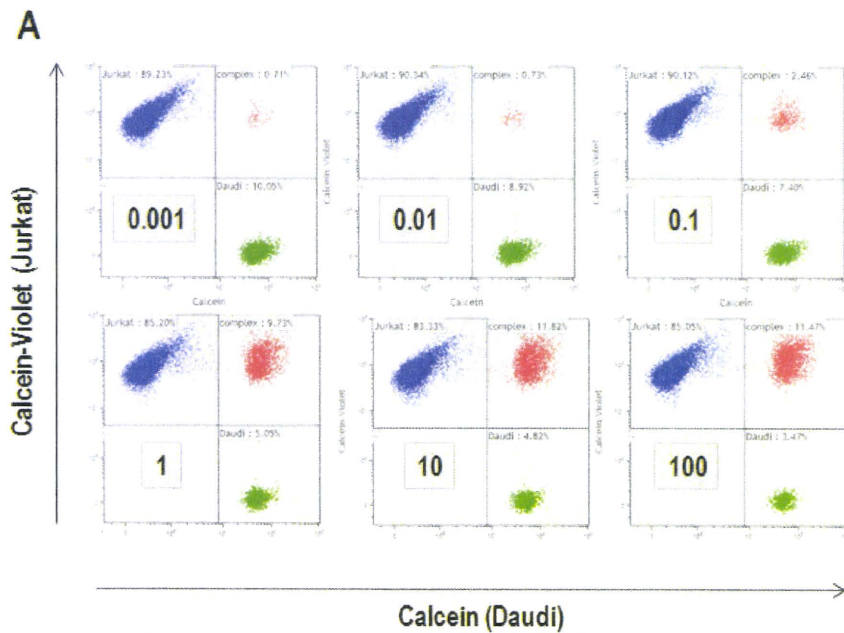


図4 Rituximab による Bridging Assay

A: Rituximab の添加濃度 (µg/ml) を変化させた際のドットプロット  
 緑色—Daudi 細胞、青色—Jurkat/FcγRIIIa 細胞、赤色—架橋された細胞

B: 抗体濃度に依存した架橋細胞の割合の変化

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュトリーサイエンス総合研究事業）  
分担研究報告書

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

研究分担者 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  
協力研究者 日向昌司 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部第三室主任研究官

**研究要旨** 大腸菌及び CHO 細胞での発現系で生産した組換え抗ヒト VEGF 抗体医薬品製剤の生物活性について VEGF による HUVEC の増殖促進の阻害アッセイ及び表面プラズモン共鳴法により測定した。その結果、二種類の抗ヒト VEGF 抗体製剤は VEGF による HUVEC の増殖促進の阻害ではほぼ同様の値を示した。しかし、表面プラズモン共鳴法では異なる値を示した。本結果から、VEGF による HUVEC の増殖促進の阻害アッセイは製造方法の異なる抗 VEGF 抗体製剤の活性比較に有用であることが明らかになった。しかし、少なくとも本研究で用いた測定条件において、表面プラズモン共鳴法は VEGF による HUVEC の増殖促進の阻害アッセイに代替できず、採用にあたっては、測定条件の検討など慎重に見極めることが肝要であることが明らかになった。

**A. 研究目的**

組換え DNA 技術を応用した治療用タンパク質は 1980 年代に始めて承認されて以来、多くの治療用タンパク質が開発・承認されている。現在、これらの治療用タンパク質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発品が承認されるに至っている。

治療用タンパク質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、バイオ後発品と先発品と同等/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、バイオ後発品の同等/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た。

そこで、本研究では結腸・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 A 及び B を例として製造方法の違いが生物活性に及ぼす影響について、VEGF による HUVEC の増殖促進の阻害アッセイ及び表面プラズモン共鳴法を用いて検討を行った。

**B. 研究方法**

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. 1 培地、抗 VEGF 抗体サンプル、組換え VEGF 溶液の調製及び HUVEC ストック溶液の調製

Human Endothelial-SFM 基礎培地 (GIBCO) にゲンタマイシン(三光純薬)を 50  $\mu\text{g/ml}$ 、アンフォテリシン(三光純薬)を 50  $\text{ng/ml}$ 、接合因子 (GIBCO) 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 (Invitrogen) ストック溶液 (10  $\mu\text{g/ml}$ ) に培地を加えて 120  $\text{ng/ml}$  に希釈し組換え VEGF 溶液を調製した。HUVEC ストック溶液は HUVEC (東洋紡) を添付の増殖培地で約 6 継代培養し、 $2 \times 10^6$  細胞/ml の溶液を調製し 0.3 ml ずつセラムチューブに分注し $-150^\circ\text{C}$ に保存した。

### 1. 2 操作法

抗ヒト VEGF 抗体サンプル 60  $\mu\text{l}$  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 96 穴マイクロテストプレートの各穴に 50  $\mu\text{l}$  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 2 穴ずつ添加した。

HUVEC ストック溶液を  $37^\circ\text{C}$  の水中で溶かし、3 ml の培地に加え 1100rpm で 5 分遠心した。上清を除去し  $2 \times 10^5$  細胞/ml になるように培地で懸濁した。細胞懸濁液を 50  $\mu\text{l}$  ずつ各穴に添加して 2 分間振とうした。細胞を 4 日間培養した。培地を除去後 Cell counting Kit-8 (同人化学) を 10%含む培地を各穴に 100  $\mu\text{l}$  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。

2. 表面プラズモン共鳴法を用いた 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  $25^\circ\text{C}$  で行い、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  $\mu\text{L/min}$  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。

## C. 結果

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の測定

抗ヒト VEGF 抗体製剤 A 及び B において 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 1)。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 以上でほとんど阻害がみられな

かったのに対し、抗ヒト VEGF 抗体製剤 B ではさらに阻害がみられた。

## 2. 表面プラズモン共鳴法を用いた 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の測定

抗ヒト VEGF 抗体製剤 A 及び B のセンサーグラムを示す (図 2)。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)。

### D. 考察

異なる細胞で製造した抗ヒト VEGF 抗体 A 及び B の生物活性について VEGF による HUVEC の増殖促進の阻害及び表面プラズモン共鳴法を用いた VEGF に対する結合能により測定した。

VEGF による HUVEC の増殖促進の阻害を用いたアッセイでは、増殖の 50%阻害に要する濃度は約 0.5~0.6 nM でほぼ同等であった。一方、抗ヒト VEGF 抗体製剤 A 及び B では 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、表面プラズモン共鳴法を用いた VEGF に対する結合能により生物活性を評価した場合は、上記増殖阻害アッセイの結果と異なり、両者で約 15 倍活性の違いが観察された。したがって、表面プラズモン共鳴法では、少なくとも今回用いた測定条件では、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。

表面プラズモン共鳴法での結果が、増殖アッセイと異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) に顕著な差が生じている可能性が考えられる。したがって、表面プラズモン共鳴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、注意が必要であると言えよう。なお、増殖因子とそのレセプターのように、結合定数が高く無いケースでは、通常の解析法で安定した測定が可能であるため、有効な手法である。具体的な事例として、昨年度の本研究で、製造方法の異なる HGF の生物活性の比較において表面プラズモン共鳴法を用いた場合の値と生物活性の値とが良く一致していることを報告している。

表面プラズモン共鳴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、本研究の結果は、親和性の高い抗体医薬品の活性評価に表面プラズモン共鳴法を用いる場合、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。

#### E. 結論

大腸菌及び CHO 細胞で発現させ精製した組換え抗ヒト VEGF 抗体医薬品製剤の生物活性について VEGF による HUVEC の増殖促進の阻害アッセイ及び表面プラズモン共鳴法により測定した。その結果、二種類の抗ヒト VEGF 抗体製剤は VEGF による HUVEC の増殖促進の阻害ではほぼ同様の値を示した。しかし、表面プラズモン共鳴法では異なる値を示した。本結果から製造方法の異なる抗 VEGF 抗体製剤の活性の比較には VEGF による HUVEC の増殖促進の阻害アッセイが有用であることが示された。一方、表面プラズモン共鳴法では少なくとも今回用いた測定条件で両者の活性を比較することは困難であることが明らかになった。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. 新見伸吾, 原島 瑞, 日向昌司, 川崎

ナナ 治療用タンパク質の免疫原性  
その3 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス 2010 vol. 41 No.9  
726-735

2. 新見伸吾, 原島 瑞, 日向昌司, 山口照英 治療用タンパク質の免疫原性  
その2 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス 2010 vol. 41 No.5  
390-400

3. Gotoh, Y., Ishizuka, Y., Matsuura T., Niimi S., Spheroid formation and expression of liver-specific functions of human hepatocellular carcinoma-derived FLC-4 cells cultured in lactose-silk fibroin conjugate sponges. Biomacromolecules in press (2011)

##### 2. 学会発表

1. 原島 瑞, 日向昌司, 関泰一朗, 有賀豊彦, 川崎ナナ, 新見伸吾 初代培養肝細胞において Annexin A3 は細胞周期阻害因子である P16<sup>INK4A</sup> の発現を抑制することにより肝細胞増殖を促進する  
第 83 回 日本生化学会大会、神戸 (2010 年 12 月 7-10 日)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願 なし
2. 実用新案登録 なし
3. そのほか なし

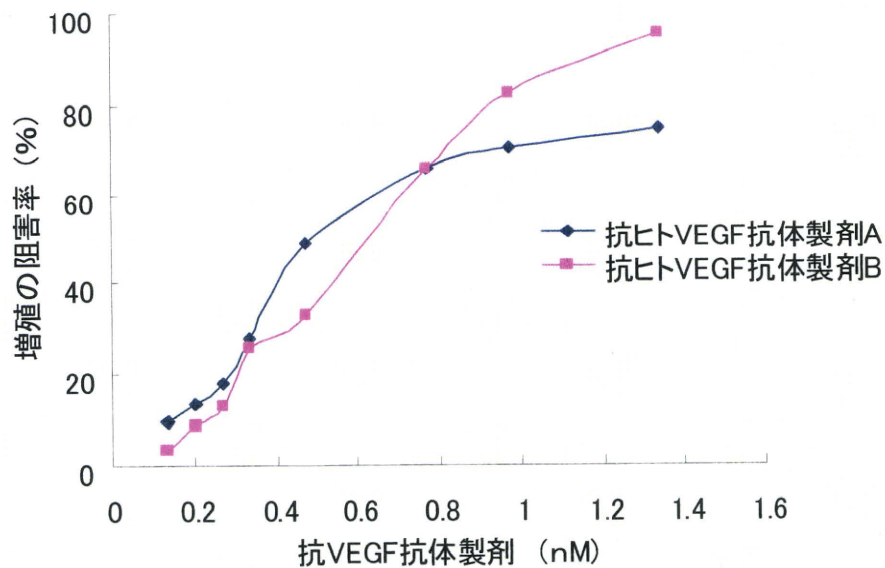


図1 VEGFによるHUVECの増殖促進の抗ヒトVEGF抗体製剤による阻害

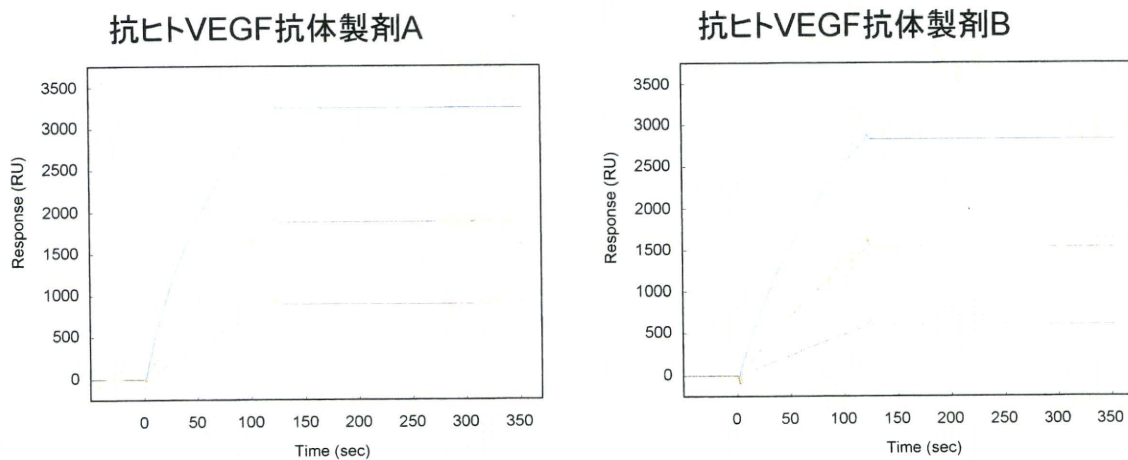


図2 共鳴プラズモン共鳴法を用いた抗ヒトVEGF抗体製剤のVEGFに対する結合のセンサーグラム



表1 表面プラズモン共鳴法を用いた抗ヒト VEGF 抗体製剤の VEGF に対する結合能

	$k_a$ ( $\times 10^4$ ) $M^{-1}s^{-1}$	$k_d$ ( $\times 10^{-7}$ ) $s^{-1}$	KD (pM)
抗ヒトVEGF抗体A製剤	2.81	7.40	26.3
抗ヒトVEGF抗体B製剤	4.60	1.84	400

## 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

研究分担者 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

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の一環として、今年度は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の排泄物からのウイルスやベクターの排出に関する基本的な考え方に関する ICH 見解を基に、今後、排出と伝播のリスク評価に国際調和ガイドラインに盛り込むべき要件について、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検討した。非臨床の排出試験は臨床での排出試験の立案、特にサンプルの種類やサンプリング頻度、試験期間の設定に有用であるが、臨床での排出試験を代替するものではない。臨床での排出試験は可能な限り初期の試験で実施すべきであり、親ウイルス/ベクターの生物学的特性、増殖能、投与量、投与経路、患者集団とその免疫状態などを考慮する必要がある。さらに、臨床では伝播の可能性と結果に関するリスク評価を実施すべきであり、評価に際して考慮すべき事項について考察した。

### A. 研究目的

遺伝子治療は、先天性遺伝子疾患やがん、心血管疾患、神経変性疾患等、現在効果的な治療法が確立されていない難病や生命を脅かす疾患、身体の機能を著しく損なう疾患に対する革新的医療として期待されている。本邦では平成 7 年に最初の臨床研究が開始されて以来、現在までに 30 件近い臨床研究・試験が実施され、治療を受けた患者数も 180 名を超えた。平成 20 年には我が国で初めての遺伝子治療薬の承認申請が出されるなど、遺伝子治療薬の開発は急速に進展している。しかし、先天性免疫不全症やレーバー先天性黒内障などで目覚ましい成果が得られている一方で、レトロウイルスベクターを用いた X 連鎖重症複合免疫不全症 (X-SCID) の遺伝子治療における白血病の発症など、遺伝子治療により予想を超える重篤な副作用の発現も認められており、遺伝子治療薬の本格的な実用化・普及には克服すべき課題は未だ多い。特に重要な

課題となるのは遺伝子治療薬の品質・安全性等の確保である。遺伝子治療薬のような先端医薬品は、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、有効性の確保には新たな評価手法の開発が望まれている。このような技術の進歩が著しい分野においては、特に臨床開発が進んでいる海外での開発動向を踏まえ、国際的な水準からみた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科学的妥当性について絶えず評価・検証し、評価手法や規制の国際調和を推進することが医薬品審査の迅速化には重要である。本研究は、以上のような現状を踏まえ、遺伝子治療薬の品質・安全性確保のための評価手法や規制に関する国際調和を推進するための基盤的研究を行うものである。

今年度は、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。

## B. 研究方法

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。

(倫理面への配慮)

本研究では倫理面への配慮が必要な試料・資料は取り扱っていない。

## C. 研究結果及び考察

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.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。

#### C.1.1 非臨床の排出試験で用いる製品

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。

#### C.1.2 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ルをあらかじめ設計しておく必要があり、プロトコ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、プロトコルの逸脱については記録しておく必要がある。

#### C.1.3 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