

functions of endogenous proteins can cause serious adverse reactions. The methods for quantifying neutralizing antibodies vary depending on the characteristics of the drugs, for example, enzyme activity assay for enzyme products, or virus-induced cytopathic effect assay for interferons. Appropriateness of the method employed should be described.

It is desirable for the antibody detection methods to be established and validated as quantitative methods with regard to specificity, precision, linearity, range, and limit of detection [46]. However, there are some difficulties in the establishment and validation of these methods, such as limited availability of positive control serum, and matrix effects due to high levels of circulating drug. Especially in early clinical studies, validation using positive control serum is difficult. The use of animal serum in which anti-drug antibodies are present is one possible approach. If international reference standards are available as a positive control, the assay could be validated using them. The influence of high levels of circulating drugs can be problematic, especially for protein products with long half-life such as recombinant monoclonal antibody drugs. Several pretreatment methods that can dissociate the antibodies from the drugs have been reported [47–49]. The appropriateness of such pretreatment methods should also be demonstrated.

Even if the investigational clinical studies were performed using an adequate study plan and validated antibody detection methods, immunogenicity-related risks for each product are not always fully revealed at the time of marketing authorization due to the limited number of patients enrolled in the clinical studies. Typical examples are the orphan drugs. In cases where further studies are necessary, risk assessment in postmarketing surveillance is also important. In the review documents of marketing authorization in Japan, we add declarations for some products that immunogenicity assessments are planned in postmarketing surveillance (e.g., lysosomal enzyme products, insulin analogue products, and interferons). Pharmacovigilance planning is reviewed before marketing authorization. In postmarketing surveillance, validation of the antibody detection method is still important. In some cases, improvement of the antibody detection method is requested by the regulatory agency at the time of marketing authorization approval. Thus, appropriate postmarketing surveillance in addition to the investigational clinical studies would reveal the immunogenicity risks of each product, regarding the frequency of emergence of binding or neutralizing antibodies and their clinical impact.

4.5. JAPANESE EXPERIENCE AND RISK-MINIMIZING APPROACH

4.5.1. Japanese Experience

The majority of protein products used in Japan is also approved overseas. Therefore, Japan and other regions might have shared similar experiences

En

regarding immunogenicity concerns. Here we introduce two unique experiences obtained in clinical studies conducted by Japanese companies. The products are recombinant human serum albumin (rHSA) and adalimumab, a recombinant human anti-TNF- α antibody. Since Eprex had not been approved in Japan, there was no accumulation of reports of the obvious adverse event of pure red cell aplasia around 2001.

Recombinant HSA produced by the yeast *Pichia pastoris* is a protein product developed by a Japanese company [50, 51]. To our knowledge it is the only product that contains rHSA as an active ingredient. It took 10 years from application to approval of the product to confirm the quality, safety, and efficacy of the product. Because the dose of rHSA, 12.5 g, is much higher than other products, the content of process-derived impurities should be reduced to as low a level as possible to ensure safety. As in the case of nonhuman glycans, some people have anti-yeast IgE before treatment due to exposure to yeast components in daily life. In the clinical study of rHSA, a challenge study was performed in anti-pichia IgE-positive healthy volunteers. Unfortunately, severe hypersensitivity reactions occurred in two of four volunteers. After that, the manufacturing process was further improved to lower the content of host-cell proteins. Then the usefulness and potential risks of the product, including hypersensitivity reactions caused by anti-pichia IgE, were carefully reviewed. In 2008, rHSA was approved. To avoid hypersensitivity reactions caused by pre-existing anti-pichia IgE, serum tests for the presence of anti-pichia IgE were made mandatory before treatment.

Adalimumab is an example that illustrates an ethnic difference in the immunogenicity of a protein drug [52]. When clinical studies of adalimumab were conducted in Japan, there had already been clinical data available overseas. When adalimumab was administered at a dose of 20 mg biweekly, the ratio of anti-adalimumab antibody (AAA)-positive patients was 40.2% in Japan compared with 17.9% in Western countries (Table 4.3). Similar results were obtained with other doses. Therefore, the incidence of AAA-positive patients was about two times higher in Japanese than in Westerners. The observed AAAs were anti-idiotypic antibodies. In AAA-positive patients, the

TABLE 4.3 Incidence of Antibody-Positive Patients in the Clinical Studies of Adalimumab

Treatment	Incidence of Antibody-Positive Patients	
	Japan (M02-575 Study)	Overseas (DE011 Study)
20 mg biweekly	40.2% (35/87)	17.9% (19/106)
20 mg weekly	–	9.8% (11/112)
40 mg biweekly	44.0% (40/91)	17.7% (20/113)
40 mg weekly	–	3.9% (4/103)
80 mg biweekly	26.4% (23/87)	–

En

clearance of adalimumab was faster and the efficacy was lower than in antibody-negative patients.

In the Pharmaceuticals and Medical Devices Agency (PMDA) review report for marketing authorization, the reasons for the high frequency of AAAs in Japan are explained by the applicant as follows: adalimumab is a fully human antibody; therefore, it was recognized as a human antibody by the endogenous immune system and was incorporated in the anti-idiotypic network, thereby resulting in the high frequency of emergence of anti-idiotypic antibodies against adalimumab. The bases of this explanation are as follows: (1) Adalimumab has the amino acid sequence of allotype GM1^{z,a}, and most (84%) Japanese have GM1^{z,a} allotype, whereas this allotype is less frequent (29%) in Westerners. (2) The observed antibodies were anti-idiotypic antibodies.

We think this explanation is just one of the possible hypotheses that could account for these observations. However, although it is recognized that human antibody products still might be immunogenic in humans, the mechanism of antibody formation might be different from that for other kinds of antibodies.

4.5.2. Risk-Minimizing Approach

Possible risk factors related to immunogenicity are shown in Table 4.4. Basically, there are two risk-minimizing approaches. The first approach, which is a pre-

TABLE 4.4 Risk Factors Related to Immunogenicity

Categories	Risk Factors
<i>Product-Related</i>	
Protein primary structure	Xenogeneic sequences Effector T-cell epitopes Same sequence as endogenous protein with unique and critical functions
Post-translational modification	Nonhuman glycans
Biological activity	Immunostimulatory function
Purity	Product-related impurities Process-related impurities
Route	Subcutaneous Intramuscular
Administration	Repeat
<i>Patient-Related</i>	
Genetic background	Genetic defect of the corresponding gene Specified HLA type
Immune state	Not suppressed
Pre-existing antibody against process-related impurities	Present
Previous treatment	Treatment with similar protein products
Concomitant treatment	Immunostimulatory drugs

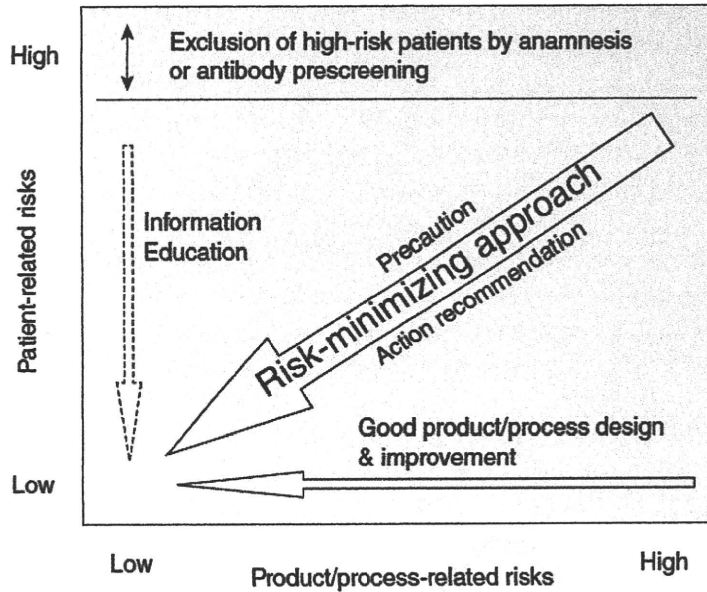


Fig. 4.2 Approaches for minimizing risks related to immunogenicity. (This figure was drawn with reference to the framework of the presentation of J. Ramsbotham, Solvay Pharm. NL/EFPIA.)

requisite, is to reduce product-related and process-related risks as much as possible, whenever they are already known or predicted. This includes good product and process design and improvement along with drug development, which should be carried out and justified primarily by the manufacturers. The second approach is to manage treatment with the known risks in mind. So, the critical step is to identify both product- and process-related risks specific to each case. Figure 4.2 illustrates this risk-minimizing approach.

4.5.2.1. Reducing Product-Related Risk Factors. In the initial stages of drug development, if there are several candidates with different amino acid sequences available for selection, the least immunogenic sequence based on *in silico* experiments would be the preferable choice. For any kind of product, the manufacturing process and formulation should be optimized to reduce process- and product-related impurities that are known to affect immunogenicity, for example, host-cell proteins and aggregates. Selecting the route of administration may also contribute to reducing the risk of immunogenicity, if appropriate.

4.5.2.2. Management of Treatment with the Known Risks in Mind. Even if product- and process-related risk factors are minimized by good product and process design and improvement during drug development, residual risks still exist. In addition, patient-related risks are difficult for the manufacturers to manage. One of the possible approaches for minimizing patient-related risks

En

is to exclude high-risk patients by antibody prescreening tests or by using the anamnesis of each patient. The case of rHSA is a good example of this approach. Administration of a product to those patients who have experienced hypersensitivity reactions to that product or other products containing similar active ingredients is considered to be a contraindication for almost all products.

Another possible approach is for the product label to state the precautions to be taken. In Japan, for protein products for which immunogenicity-related risks are a concern, the precautions and recommended actions to be taken are written on the product label (Table 4.5). During the review for marketing authorization approval, the precautions and recommended actions to be taken are decided upon by a discussion based on the clinical data. The aforementioned contraindication and the necessity of IgE prescreening for rHSA are examples of precautions written on product labels (Table 4.5A,B). As shown in Table 4.5C, recommended actions are provided on the label together with the known risks of the product. For example, in the case of lysosomal enzyme products such as agalsidase beta used for enzyme replacement therapy in which anti-drug IgG was detected at a high frequency in clinical studies, periodic tests for anti-drug IgG are recommended. For products for which the emergence of neutralizing antibodies is a concern, for example, interferon beta-1a, neutralizing-antibody assays are recommended in the cases where efficacy is insufficient or decreases after repeated administration. For products containing xenogeneic amino acid sequences, precautions about the emergence of hypersensitivity reactions after repeated administration are written on the product label. In the case of patients who have been treated with similar therapeutic protein products, for example, mouse monoclonal antibodies or chimeric antibodies, it is stated on the product label that such patients should be screened for the presence of pre-existing antibodies such as human anti-mouse antibody (HAMA) or human anti-chimeric antibody (HACA).

In addition to written notices on product labels, education of physicians and patients is also important. The first purpose is to ensure that the precautions written on the product label are implemented. Providing information to physicians about possible clinical symptoms caused by the emergence of antibodies will help reduce such risks. The other purpose is to ensure the proper handling of products, because inadequate handling of products such as storage under inappropriate conditions may potentiate immunogenicity-related risks by increasing product-related impurities or leachate from containers.

4.6. CONCLUDING REMARKS

Experience gained from the use of therapeutic protein products has shown that concern about immunogenicity cannot be fully eliminated. However, due to their specific efficacy in various diseases, protein drugs are indispensable therapeutic agents the use of which cannot be substituted by the use of small-

En

TABLE 4.5 Examples of Immunogenicity-Related Precautions Written in Product Labels Approved in Japan

<i>(A) Contraindication</i>	
Product	Contraindication
Almost all products	Patients who have anamnesis of hypersensitivity reactions to components of the product or other products containing similar active ingredient
<i>(B) Mandatory Prescreening</i>	
Product	Precaution
Human serum albumin	Hypersensitivity reactions can occur in patients who have anti-pichia antibody.
	Obligation
	Anti-pichia IgE prescreening
<i>(C) Recommended Actions</i>	
Product	Recommended Action
Agalsidase beta	Periodic IgG testing
Laronidase	
Alglucosidase alfa	
Idursulfase	
Galsulfase	
Mecasermin	Antibody prescreening by skin prick test to predict hypersensitivity reactions
	Discontinuation of treatment if decrease in efficacy is observed with emergence of antibody
	Inhibitor test if decrease in efficacy is observed <input type="checkbox"/>
Octocog alfa	Discontinuation of treatment if PRCA is observed
Ruriotocog alfa	
Epoetin alfa	Attention should be paid to the possible emergence of inhibitors.
Epoetin beta	Pure red cell aplasia (PRCA) can be caused by anti-erythropoietin antibody.
Darbepoetin alfa	Anti-drug antibody can be induced by continuous treatment.
Somatropin	Discontinuation of treatment if decrease in efficacy is observed with emergence of antibody
	Test for neutralizing antibodies if efficacy is insufficient after 1 year of treatment
Interferon beta-1a	Neutralizing antibodies can emerge.

molecule chemical drugs. It should also be noted that immunogenicity-related risk factors may be specific to the individual protein drug and its intended clinical use. Taken together, it is critical to minimize potential adverse immunogenic consequences in the clinical use of products of interest by a case-by-case approach. In the future, designing or selecting less immunogenic molecules will be more important and feasible based on the recent progress in *in silico* technology for estimating the immunogenicity of proteins. It will be desirable to have relevant animal models validated to reliably predict the potential of a protein to induce immunogenic responses in humans, and long-term clinical studies enrolling a large number of patients at a preapproval stage. However, at least in the near future due to technical limitations, data from preapproval nonclinical and clinical studies may be insufficient to identify all immunogenic safety profiles. Therefore, safety with respect to immunogenicity can only be assessed through (long-term well-designed) postapproval surveillance programs.

In summary, immunogenicity-related risks of protein products may be minimized by reducing the immunogenicity-related impurities to as low a level as possible, identifying the risk factors for individual product and patients, excluding high-risk patients by antibody prescreening or anamnesis, monitoring antibodies by appropriate tests periodically or in a timely manner, and ensuring the implementation of written precautions and recommendations on product labels.

REFERENCES

1. Rosenberg, A.S., Worobec, A. (2004). A risk-based approach to immunogenicity concerns of therapeutic protein products. Part 2. Considering host-specific and product-specific factors impacting immunogenicity. *BioPharm Int*, Dec. 1, 34–42.
2. Rosenberg, A.S., Worobec, A. (2005). A risk-based approach to immunogenicity concerns of therapeutic protein products. Part 3. Effects of manufacturing changes in immunogenicity and the utility of animal immunogenicity studies. *BioPharm Int*, Jan. 1.
3. Worobec, A., Rosenberg, A.S. (2004). A risk-based approach to immunogenicity concerns of therapeutic protein products. Part 1. Considering consequences of the immune response to a protein. *BioPharm Int*, Nov. 1, 22–26.
4. Koren, E., Zuckerman, L.A., Mire-Sluis, A.R. (2002). Immune responses to therapeutic proteins in humans—clinical significance, assessment and prediction. *Curr Pharm Biotechnol*, 3, 349–360.
5. Du, X., Tang, J.G. (1998). Effects of deleting A19 tyrosine from insulin. *Biochem Mol Biol Int*, 44, 507–513.
6. Heding, L.G., Marshall, M.O., Persson, B., Dahlquist, G., Thalme, B., Lindgren, F., Akerblom, H.K., Rilva, A., Knip, M., Ludvigsson, J., et al. (1984). Immunogenicity of monocomponent human and porcine insulin in newly diagnosed type 1 (insulin-dependent) diabetic children. *Diabetologia*, 27 (Suppl.), 96–98.

En

7. Porter, S. (2001). Human immune response to recombinant human proteins. *J Pharm Sci*, *90*, 1–11.
8. Abdul-Ahad, A.K., Galazka, A.R., Revel, M., Biffoni, M., Borden, E.C. (1997). Incidence of antibodies to interferon-beta in patients treated with recombinant human interferon-beta 1a from mammalian cells. *Cytokines Cell Mol Ther*, *3*, 27–32.
9. Larocca, A.P., Leung, S.C., Marcus, S.G., Colby, C.B., Borden, E.C. (1989). Evaluation of neutralizing antibodies in patients treated with recombinant interferon-beta ser. *J Interferon Res*, *9* (Suppl. 1), S51–S60.
10. Perini, P., Facchinetti, A., Bulian, P., Massaro, A.R., Pascalis, D.D., Bertolotto, A., Biasi, G., Gallo, P. (2001). Interferon-beta (INF-beta) antibodies in interferon-beta1a- and interferon-beta1b-treated multiple sclerosis patients. Prevalence, kinetics, cross-reactivity, and factors enhancing interferon-beta immunogenicity in vivo. *European Cytokine Network*, *12*, 56–61.
11. van de Weert, M., Moller, E.H. (2008). Immunogenicity of biopharmaceuticals: causes, methods to reduce immunogenicity, and biosimilars. In *Immunogenicity of Biopharmaceuticals*. van de Weert M, Moller EH, eds. Springer, New York, pp. 97–111.
12. Pharmaceuticals and Medical Devices Agency (PMDA). (1999). Specifications: test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products (ICH Q6B guideline). Available at http://www.pmda.go.jp/ich/q/q6b_01_5_1e.pdf
13. Casadevall, N., Nataf, J., Viron, B., Kolta, A., Kiladjian, J.J., Martin-Dupont, P., Michaud, P., Papo, T., Ugo, V., Teyssandier, I., Varet, B., Mayeux, P. (2002). Pure red-cell aplasia and antierythropoietin antibodies in patients treated with recombinant erythropoietin. *New Engl J Med*, *346*, 469–475.
14. Chamberlain, P., Mire-Sluis, A.R. (2003). An overview of scientific and regulatory issues for the immunogenicity of biological products. *Dev Biol*, *112*, 3–11.
15. Li, J., Yang, C., Xia, Y., Bertino, A., Glaspy, J., Roberts, M., Kuter, D.J. (2001). Thrombocytopenia caused by the development of antibodies to thrombopoietin. *Blood*, *98*, 3241–3248.
16. Pavlovic, M., Girardin, E., Kapetanovic, L., Ho, K., Trouvin, J.H. (2008). Similar biological medicinal products containing recombinant human growth hormone: European regulation. *Hormone Res*, *69*, 14–21.
17. De Groot, A.S., Moise, L. (2007). Prediction of immunogenicity for therapeutic proteins: state of the art. *Curr Opin Drug Discov Dev*, *10*, 332–340.
18. Foged, C., Sundblad, A. (2008). Immune reactions towards biopharmaceuticals—a general, mechanistic overview. In *Immunogenicity of Biopharmaceuticals*. van de Weert M, Moller EH, eds. Springer, New York, pp. 1–25.
19. European Medicines Agency (EMA). (2007). Guideline on immunogenicity assessment of biotechnology-derived therapeutic proteins (EMA/CHMP/BMWP/14327/2006). Available at <http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/biosimilar/1432706enfin.pdf>
20. De Groot, A.S., McMurry, J., Moise, L. (2008). Prediction of immunogenicity: in silico paradigms, ex vivo and in vivo correlates. *Curr Opin Pharmacol*, *8*, 620–626.
21. De Groot, A.S., Moise, L., McMurry, J.A., Wambre, E., Van Overtvelt, L., Moingeon, P., Scott, D.W., Martin, W. (2008). Activation of natural regulatory T cells by IgG Fc-derived peptide “Tregitopes.” *Blood*, *112*, 3303–3311.

22. Dingermann, T. (2008). Recombinant therapeutic proteins: production platforms and challenges. *Biotechnol J*, 3, 90–97.
23. Chung, C.H., Mirakhur, B., Chan, E., Le, Q.T., Berlin, J., Morse, M., Murphy, B.A., Satinover, S.M., Hosen, J., Mauro, D., Slebos, R.J., Zhou, Q., Gold, D., Hatley, T., Hicklin, D.J., Platts-Mills, T.A. (2008). Cetuximab-induced anaphylaxis and IgE specific for galactose- α -1,3-galactose. *New Engl J Med*, 358, 1109–1117.
24. McKenzie, I.F., Xing, P.X., Vaughan, H.A., Prenzoska, J., Dabkowski, P.L., Sandrin, M.S. (1994). Distribution of the major xenoantigen (gal (α 1–3)gal) for pig to human xenografts. *Transplant Immunol*, 2, 81–86.
25. Tangvoranuntakul, P., Gagneux, P., Diaz, S., Bardor, M., Varki, N., Varki, A., Muchmore, E. (2003). Human uptake and incorporation of an immunogenic nonhuman dietary sialic acid. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100, 12045–12050.
26. Higashi, H., Naiki, M., Matuo, S., Okouchi, K. (1977). Antigen of “serum sickness” type of heterophile antibodies in human sera: identification as gangliosides with *N*-glycolylneuraminic acid. *Biochem Biophys Res Commun*, 79, 388–395.
27. Kasukawa, R., Kano, K., Bloom, M.L., Milgrom, F. (1976). Heterophile antibodies in pathologic human sera resembling antibodies stimulated by foreign species sera. *Clin Exp Immunol*, 25, 122–132.
28. Merrick, J.M., Zadarlik, K., Milgrom, F. (1978). Characterization of the Hanganutziu-Deicher (serum-sickness) antigen as gangliosides containing *N*-glycolylneuraminic acid. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 57, 477–480. 5
29. Rosenberg, A.S. (2006). Effects of protein aggregates: an immunologic perspective. *AAPS J*, 8, E501–E507.
30. Kessler, M., Goldsmith, D., Schellekens, H. (2006). Immunogenicity of biopharmaceuticals. *Nephrol Dial Transpl*, 21 (Suppl. 5), v9–v12.
31. Bachmann, M.F., Dyer, M.R. (2004). Therapeutic vaccination for chronic diseases: a new class of drugs in sight. *Nature Rev*, 3, 81–88.
32. Wang, W. (2005). Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceuticals. *Int J Pharm*, 289, 1–30.
33. Barbosa, M.D., Celis, E. (2007). Immunogenicity of protein therapeutics and the interplay between tolerance and antibody responses. *Drug Discov Today*, 12, 674–681.
34. Schijns, V.E. (2000). Immunological concepts of vaccine adjuvant activity. *Curr Opin Immunol*, 12, 456–463.
35. Storni, T., Kundig, T.M., Senti, G., Johansen, P. (2005). Immunity in response to particulate antigen-delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev*, 57, 333–355.
36. Ryan, M.H., Heavner, G.A., Brigham-Burke, M., McMahon, F., Shanahan, M.F., Gunturi, S.R., Sharma, B., Farrell, F.X. (2006). An in vivo model to assess factors that may stimulate the generation of an immune reaction to erythropoietin. *Int Immunopharmacol*, 6, 647–655.
37. Sharma, B. (2007). Immunogenicity of therapeutic proteins. Part 1. Impact of product handling. *Biotechnol Adv*, 25, 310–317.
38. Barbosa, M.D., Vielmetter, J., Chu, S., Smith, D.D., Jacinto, J. (2006). Clinical link between MHC class II haplotype and interferon-beta (IFN-beta) immunogenicity. *Clin Immunol*, 118, 42–50.

En

39. Pharmaceuticals and Medical Devices Agency (PMDA). (1997). Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals (ICH S6 guideline). Available at http://www.pmda.go.jp/ich/s/s6_00_2_22e.pdf
40. Roggen, E.L. (2008). Models for prediction of immunogenicity. In *Immunogenicity of Biopharmaceuticals*. van de Weert M, Moller EH, eds. Springer, New York, pp. 75–95.
41. Stas, P., Lasters, I. (2009). Strategies for preclinical immunogenicity assessment of protein therapeutics. *IDrugs*, 12, 169–173.
42. Koren, E., De Groot, A.S., Jawa, V., Beck, K.D., Boone, T., Rivera, D., Li, L., Mytych, D., Koscec, M., Weeraratne, D., Swanson, S., Martin, W. (2007). Clinical validation of the “in silico” prediction of immunogenicity of a human recombinant therapeutic protein. *Clin Immunol*, 124, 26–32.
43. Depil, S., Angyalosi, G., Morales, O., Delacre, M., Delhem, N., Francois, V., Georges, B., Hammer, J., Maillere, B., Auriault, C., Pancre, V. (2006). Peptide-binding assays and HLA II transgenic Abeta degrees mice are consistent and complementary tools for identifying HLA II–restricted peptides. *Vaccine*, 24, 2225–2229.
44. Palleroni, A.V., Aglione, A., Labow, M., Brunda, M.J., Pestka, S., Sinigaglia, F., Garotta, G., Alsenz, J., Braun, A. (1997). Interferon immunogenicity: preclinical evaluation of interferon-alpha 2a. *J Interferon Cytokine Res*, 17 (Suppl. 1), S23-S27.
45. Swanson, S.J. (2007). Assays and strategies for immunogenicity assessment. Presented at BMWP/BWP workshop on immunogenicity assessment of therapeutic proteins. Available at <http://www.emea.europa.eu/pdfs/conference/flyers/bmwp/swanson.pdf>
46. Pharmaceuticals and Medical Devices Agency (PMDA). (1994). Validation of analytical procedures: text and methodology (ICH Q2 guideline). Available at http://www.pmda.go.jp/ich/q/q2r2_97_10_28e.pdf
47. Bourdage, J.S., Cook, C.A., Farrington, D.L., Chain, J.S., Konrad, R.J. (2007). An affinity capture elution (ACE) assay for detection of anti-drug antibody to monoclonal antibody therapeutics in the presence of high levels of drug. *J Immunol Methods*, 327, 10–17.
48. Patton, A., Mullenix, M.C., Swanson, S.J., Koren, E. (2005). An acid dissociation bridging ELISA for detection of antibodies directed against therapeutic proteins in the presence of antigen. *J Immunol Methods*, 304, 189–195.
49. Smith, H.W., Butterfield, A., Sun, D. (2007). Detection of antibodies against therapeutic proteins in the presence of residual therapeutic protein using a solid-phase extraction with acid dissociation (SPEAD) sample treatment prior to ELISA. *Regul Toxicol Pharmacol*, 49, 230–237.
50. Pharmaceuticals and Medical Devices Agency (PMDA). (2007). Human serum albumin (genetical recombination); PMDA approval report (in Japanese). Available at http://www.info.pmda.go.jp/shinyaku/g071007/400315000_21900AMZ00083_Q101_1.pdf
51. Kobayashi, K. (2006). Summary of recombinant human serum albumin development. *Biologicals*, 34, 55–59.
52. Pharmaceuticals and Medical Devices Agency (PMDA). (2008). Adalimumab (genetical recombination); approval report from PMDA (in Japanese). Available at http://www.info.pmda.go.jp/shinyaku/g080405/10015900_22000AMX01598_A101_1.pdf

最近の日局における生物薬品各条及び 生物薬品関連試験法の改正について*2

早川 堯夫*1

本稿では、最近の日局における生物薬品各条及び生物薬品関連試験法の改正について述べます。

最近の日局改正について、既に告示されたものと今後告示予定のスケジュールを Table 1 に示します。

生物薬品各条及び生物薬品関連試験法を審議している生物薬品委員会は 15 名の委員から構成されています。Table 2 に平成 21 年 8 月 25 日現在の生物薬品委員会開催実績を示します。平成 18 年度は 5 回、平成 19 年度は 4 回、平成 20 年度は 4 回、平成 21 年度は 3 回開催し、1 回の開催当たりの審議時間は 3 時間あまり、延べ 50 時間以上審議を行ってきました。

1. 第十五改正第一追補及び平成 20 年 7 月の 部分改正の概要

第十五改正第一追補¹⁾では、注射用テセロイキン（遺伝子組換え）、プロタミン硫酸塩、プロタミン硫酸塩注射液の 3 品目を改正し、平成 20 年 7 月の部分改正では、ヘパリンナトリウムを改正しています。

ヘパリンナトリウムの部分改正は、アメリカを中心として異物混入ヘパリンにより有害事象が多発したことを受けて、緊急対応として、過硫酸コンドロイチン硫酸 (OSCS) 限度試験を規定したものです。

1.1 ヘパリンナトリウム改正の経緯

2007 年 11 月にアメリカ等でヘパリンナトリウム投与によるアナフィラキシーが頻発し、死者が 200 名以上出た問題について、2008 年 3 月に FDA が原因物質として OSCS を発表しました。これを受けて 2008 年 7 月に日局を一部改正し、OSCS の限度試験を設定しました。

更に 2010 年 1 月には、後述する確認試験及び純度試験の改正を行う予定としています (2010 年 3 月現在まだ改正されていない)。

1.2 OSCS 限度試験

ヘパリンナトリウム及び OSCS の混入ヘパリンナトリウムの ¹H-NMR スペクトルを Fig. 1 に示します。もしヘパリンナトリウムの中に OSCS が混入しているとなれば、2.18 付近に OSCS の *N*-アセチル基由来のピークが他のピークと重ならず特異的に検出されます。これを利用して OSCS の混在許容量を規定しています。

2. 第十五改正第二追補の概要

第十五改正第二追補²⁾では、生物薬品各条の新規収載がカルシトニン (サケ)、精製ヒアルロン酸ナトリウム及びヘパリンカルシウムの 3 品目、改正がヒト下垂体性腺刺激ホルモン、バソプレシン注射液、プロタミン硫酸塩注射液、ヘパリンナトリウムの 4 品目です。生物薬品関連試験法としては、一般試験法の新規収載がたん白質のアミノ酸分析法、参考情報の改正が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です。

2.1 新規収載：カルシトニン (サケ) (Table 3)

基原に記載されていますように、本品は、合成された 32 個のアミノ酸残基からなるポリペプチドで、血中カルシウム濃度低下作用を有するホルモンです。

規格項目は、性状、確認試験、吸光度、旋光度、構成アミノ酸、ペプチド含量、純度試験、水分及び定量法と

*1 近畿大学薬学総合研究所 大阪府東大阪市小若江 3-4-1 (〒577-8502)

*2 当協会主催の第 3 回日本薬局方に関する説明会 (平成 21 年 8 月 26 日：東京、9 月 1 日：大阪) における講演による。

Table 1 最近の日局改正について

・ 第十五改正：平成 18 年 3 月告示
・ 同第一追補：平成 19 年 9 月告示
・ 部分改正：平成 20 年 7 月告示
・ 同第二追補：平成 21 年 9 月告示
・ 部分改正：平成 22 年 1 月告示予定
・ 第十六改正：平成 23 年 3 月告示予定

Table 2 生物薬品委員会 審議状況

委員数：15 名（平成 21 年 8 月 25 日現在）
委員会開催実績：
平成 18 年度 第 1 回～第 5 回（5 回）
平成 19 年度 第 6 回～第 9 回（4 回）
平成 20 年度 第 10 回～第 13 回（4 回）
平成 21 年度 第 14 回～第 16 回（3 回）

Table 3 新規収載：カルシトニン（サケ）

局外規からの移行された品目
基原：本品は、合成された 32 個のアミノ酸残基からなるポリペプチドである。本品は、ホルモンで血中カルシウム濃度低下作用を有する。
規格項目
・ 性状
・ 確認試験：紫外吸収スペクトル
・ 吸光度
・ 旋光度
・ 構成アミノ酸
・ ペプチド含量：80.0%以上
・ 純度試験：酢酸 7.0%以下，類縁物質 3%以下
・ 水分：電量滴定法，10.0%以下
・ 定量法：バイオアッセイ
EP，USP は液体クロマトグラフィーによる定量法を採用しているが，標準品の供給が困難なためバイオアッセイとした。

なっています。

EP 及び USP では、本品の定量法に液体クロマトグラフィーを採用していますが、日局では標準品の供給が困難なためバイオアッセイを採用しています。

本品は、日本薬局方外医薬品規格（局外規）から移行された品目です。Table 4 に局外規からの主な変更点を示します。

名称は「サケカルシトニン（合成）」から「カルシトニン（サケ）」に、性状は「水に極めて溶けやすい」から「水に溶けやすい」に、紫外吸収スペクトルを用いた確認試験は吸収極大の記載から参照スペクトルとの比較に変更しています。

構成アミノ酸については、溶解液を変更し、アミノ酸

分析の試験条件の詳細を記載することになっています。

酢酸に関する純度試験については、局外規ではガスクロマトグラフィーで測定していましたが、日局では国際調和の観点から EP で採用されている液体クロマトグラフィーが提案され、採用されています。ただし、EP とは試料を溶解する溶媒と含量規格が異なります。

溶媒の違いは、試料を溶解するのに日局は水、EP は移動相 A（リン酸緩衝液 pH 3.0）：B（メタノール）=95：5 を用いるというところです。

酢酸の規格については、日局は 7.0%以下、EP は 4.0～15.0%と幅記載になっている点で異なります。日本では局外規の時も 7.0%以下でした。パブコメの際に、

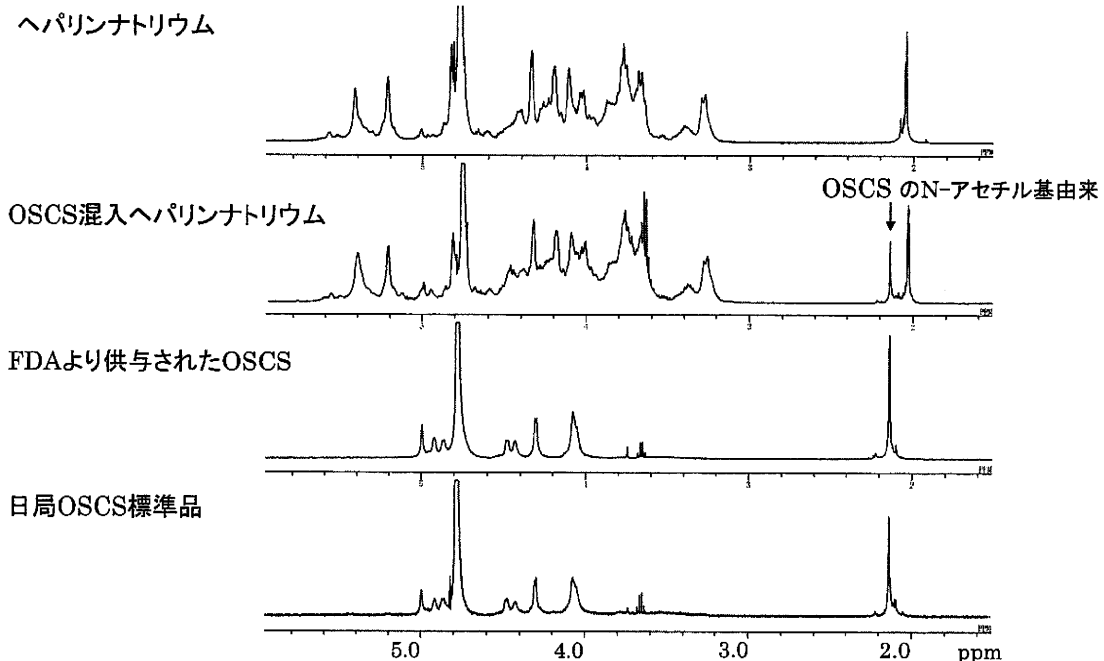


Fig. 1 ヘパリンナトリウム及びOSCS混入ヘパリンナトリウムの¹H-NMR

Table 4 カルシトニン(サケ)：局外規からの主な変更点

項目	局外規	日局
名称	サケカルシトニン(合成)	カルシトニン(サケ)
性状	水に極めて溶けやすい	水に溶けやすい
確認試験 紫外吸収スペクトル 構成アミノ酸	吸収極大の記載	参照スペクトルとの比較
純度試験(酢酸)	ガスクロマトグラフィー	液体クロマトグラフィー EPとの国際調和(但し溶媒, 含量規格はEPとは異なる)
水分	容量滴定法(直接滴定) 通例水分を5~50mgを含む試料に適用	電量滴定法 水分含量(2mg以下)を考慮し, より適切な方法に変更
定量法		「エーテル麻醉下」を削除 苦痛を与えない方法に変更

酢酸含量をEPに統一して欲しいとの意見がありました。市販製品の多くが酢酸3%台ということで、下限がEPの規格をはずれたところにありますので、わが国の現状を反映した規定になっています。

水分については、サンプルの水分含量を考慮し、従来の容量滴定法からより適切な方法である電量滴定法に変更しました。

定量法は、シロネズミに投与後1時間の血清カルシウム量を測定する方法で、カルシトニンの骨吸収抑制に伴う血清カルシウム低下作用を利用しています。なお、局外規ではエーテル麻醉下となっていたのですが、麻醉をエーテル麻醉に限定する必要はなく、またエーテル麻醉では覚醒することがあるため苦痛を与える可能性があるとの指摘がありました。そこで、「エーテル麻醉下」を削除し、苦痛を与えない方法を選択することとしました。

2.2 精製ヒアルロン酸ナトリウム Q&A

新規収載にあたってのポイントをQ&A方式で解説します。

質問 1 名称変更の理由は？

回答 1 日局に収載予定の「精製ヒアルロン酸ナトリウム」には注射剤と点眼剤が予定されています。当然それらは日局各条の規格に適合する必要があります。これを外用剤の添加剤として使用されているヒアルロン酸ナトリウムと区別するため、各条日本名に「精製」を付けて、「精製ヒアルロン酸ナトリウム」としました。

質問 2 基原の平均分子量について、収載理由は？

回答 2 市場の流通実態を考慮しますと、平均分子量で2つのグループに分けられ、それらを反映した規定が

必要と考えられましたので収載することとしました。日局では本品が本試験法で規定されているいずれかの平均分子量の規格に適合することを求めています。平均分子量を換算する計算式について、科学的に最適ではないとの指摘を受けましたが、科学技術の進歩に伴う測定法の改正は今後の検討課題とすることとし、現段階では本試験内容が妥当と判断して設定しました。

平均分子量そのものを真に表現できることが最もよいわけですが、「こういう試験法でこういう操作法でやるときに、こういう規格に適合する」という規定の仕方でconsistencyがあることも、品質コントロールの一つのあり方であり、現段階ではそのような見方をして平均分子量の規定をしているとご理解をお願いします。

質問 3 pHの試験条件の変更及び削除の要望について。

回答 3 本品は粘性が高く、容易に溶解することではできないとの指摘がありました。濃度を下げてまでpHを設定する意義は低いものと判断し、削除しました。

質問 4 現在の承認規格に一致させてほしい。

回答 4 承認審査時の規格は、個々の製品について開発時の数少ないロットでの結果から設定されていますが、日局原案審議に当たっては、承認後日本国内に流通している製品の実測値をもとに設定しています。したがって、日局の規格値は必ずしも承認規格に一致するものではありません。

質問 5 EPの規格及び試験方法と一致させてほしい

回答 5 日局原案審議に当たっては、海外の薬局方も参考としていますが、日本で流通している製品の品質を

考慮し、主として国内流通製品の規格及び試験方法、実測値等をもとに設定しています。したがって、必ずしもEP等の海外薬局方の規格及び試験方法に一致するものではありません。

質問 6 純度試験 (7) 溶血性連鎖球菌及び (8) 溶血性の項目は必要ないのでは？

回答 6 基原がニワトリの鶏冠 (トサカ) の場合と微生物由来の場合があります。微生物由来の場合、混入の可能性を完全否定できないことから、安全上、管理すべき事項であるとの判断に基づき、設定しました。

質問 7 エンドトキシンの項を削除した理由は？

回答 7 日本薬局方では、エンドトキシンは原薬ではなく製剤で規定することを基本としていますので、項目を設定しません。原薬についても厳重に管理が必要があると思いますが、各社の責任において管理をお願いします。

質問 8 抗原性の項目が削除された理由は？

回答 8 抗原性は過去の実績を考慮し、また動物福祉の観点から設定しないこととしました。

質問 9 微生物限度試験において、精製ヒアルロン酸ナトリウムを1g使用することはメンブランフィルターの目詰まりを起こす等、困難であるので、使用量を0.1gとして欲しい。

回答 9 「1g当たり」であり、使用量を1gと規定したものではありません。

2.3 たん白質のアミノ酸分析法

参考情報の「アミノ酸分析法」を一般試験法化し、新規試験法として「たん白質のアミノ酸分析法」を規定しました。これに伴っていくつかの試薬も「生化学用又はアミノ酸分析用に製造したもの」として新たに規定しました。

国際調和文書である参考情報をどのように一般試験法化するかが議論のポイントでしたが、アミノ酸分析法の場合、一般試験法と参考情報に単純に切り分けることは困難であったことから、試験法の原理・原則の部分を抜粋して一般試験法を作成し、参考情報はそのまま残すこととしました。このため、一般試験法の名称は「たん白質のアミノ酸分析法」とし、参考情報「アミノ酸分析法」と区別しました。USPも調和文書と別の文書の二つとなっています。

国際調和文書は、科学的な原理・原則について認識を

共有することは当然の前提ですが、フォーマットのには必ずしも日本薬局方における一般試験法に配慮して作ったものではありません。ちなみにアミノ酸分析法の国際調和文書は、原理・原則とともに解説、説明等が多く掲載され、日局の一般試験法の書き振りとは異なっています。「たん白質のアミノ酸分析法」は国際調和文書を参考情報とし、それを一般試験法化した一つモデルケースと思います。

参考情報には他にも国際調和された生物薬品関連の分析法が記載されていますが、これらを一般試験法化する際には必要に応じて同様の方法によると思います。一般試験法化により、各条の記載も、試験法名や試験法番号等を記載するなどの変更があります。なお、医薬品各条における試験法の表記方法については、17局原案作成要領に盛り込む予定となっています。

一般試験法「たん白質のアミノ酸分析法」の1.たん白質及びペプチドの加水分解には、方法1から方法11までであり、また2.アミノ酸分析方法には、方法1から方法7まであります。本文中、もしくは試験条件にこれらの方法番号を記載することで簡略化を行います。

医薬品各条で本試験法を用いる場合については、委員会で議論されていませんが、案としては加水分解と分析方法の項立てとすれば、方法番号を記載することができると考えます。「加水分解 方法1による。」と冒頭に記載し、その後にはこれまでと同様の記載を行い、最後は「試料溶液及び標準溶液とする。」となります。分析方法についても、同様に項を立て、「分析方法 試料溶液及び標準溶液〇μLずつを正確にとり、次の条件でたん白質のアミノ酸分析法<2.04>方法1により試験を行うとき、…」と続き、その後には試験条件やシステム適合性が続きます。

ただし、以前委員会で議論になりましたように、アミノ酸分析ではほとんど全自動の装置を使用しますので、試験条件やシステム適合性も装置メーカーによって異なり、一律に規定することは困難と思われる。試験条件やシステム適合性をどこまで規定するのは、今後の問題として残っています。

2.4 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 (Table 5)

マイコプラズマは無細胞壁の原核生物で、人工培地に生育可能な最小の微生物であり、培養細胞を高頻度に汚染します。本試験法の適用対象は、現在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用いる細胞基材としていますが、今後再生医療において数多く

Table 5 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

マイコプラズマ：	無細胞壁の原核生物で、人工培地に生育可能な最小の微生物であり、培養細胞を高頻度に汚染
適用対象：	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
試験法：	A. 培養法 マイコプラズマを人工培地で培養・増殖させて検出 B. 指標細胞を用いた DNA 染色法 マイコプラズマを指標細胞で増殖後、DNA 染色によりマイコプラズマ DNA を検出 C. ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) による検出法 マイコプラズマ DNA を特異的プライマーを用いて PCR 検出

の細胞由来製品が作られる際に有効に使えるものと思います。

試験法は、培養法、指標細胞を用いた DNA 染色法及びポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) による検出法の三つの方法が記載されております。

本試験法は 10 年前の第十三改正日本薬局方第二追補に参考情報として初めて収載され、第十五改正日本薬局方第二追補で初めての改正となります。

主な改正点は、培養法の培養条件及び指標菌株と接種量の表示単位です。

培養法の培養条件は、欧米との国際調和を考慮して改正するものです。従来、カンテン平板培地、液体培地とも好気性及び嫌気性で半数ずつ培養していたものを、改正案ではカンテン平板培地は微好気的条件、すなわち 5~10% の炭酸ガスを含む窒素ガス中のみとし、液体培地は気相の条件記載を削除しました。

指標菌株と接種単位については、従来の問題点として、DNA 染色法で陽性対象として例示されていた指標菌はコロニーを形成せずに接種が困難であること、また 100 CFU 以下の接種では陽性反応が認められないことなどが指摘されておりました。

この問題点を勘案し、より適切に対応できるようにするため、まず、指標菌株を従来の菌株名から ATCC コード番号 (具体的には、*M. hiorhinitis* DBS1050 及び *M. orale* CH19299 をそれぞれ ATCC29052 及び ATCC17981) に変更しました。これは、従来の呼称では菌株名が同じでも保存所や保存条件が異なることにより試験への不適切性が起こる可能性があるため、ATCC コード番号で表示することで、より適切な菌株を入手できるようにとの意図からです。EP でも同様の表示としています。更に、指標菌の接種量の表示単位として従来の CFU (コロニー形成単位) に加えて、コロニーを形成しない場合に対応するための CCU (色調変化単位) を併記しまし

た。

併せて、DNA 染色法の指標菌の例にコロニーを形成しやすい菌株 (*M. hiorhinitis* BTS7) を追加しました。

更にコロニーを形成せず、接種が困難あるいは陽性反応が認められないものの中には、継代数を重ねると培地に順化して細胞に接種ができなくなるものもありますので、改正案では「継代数の低いものを使用する」と明記しました。なお、EP では 15 継代以下の規定となっています。

3. 平成 22 年 1 月告示予定の部分改正

平成 21 年 8 月 25 日開催の薬事・食品衛生審議会日本薬局方部会です承された部分改正です。

3.1 ヘパリンナトリウム (Table 6)

従来、ヘパリンナトリウムは各条の中で主として活性のみを規定していましたが、同じような活性を持つ異物を混入してヘパリンに替えたためにヘパリンの事件が発生しました。

この事件から、生物活性のみではなく、理化学的な面からもヘパリンナトリウムの本質をとらえ、コントロールすべきとの考えとなりました。その一環として、まずヘパリンであることを理化学的に確認するために、弱陰イオン交換樹脂の HPLC (WAX-HPLC) でクロマトグラフィーを行い、ヘパリンナトリウム標準品と保持時間が一致することをみるという確認試験を設定しました。

純度試験は、過硫酸化コンドロイチン硫酸 (OSCS) の項に関して、まだ危機管理措置を続ける必要があるとの判断から、¹H-NMR を使った従来の方法を更に感度を高めた方法に変更されています。

一方、後述するように、将来の品質管理の方向性を示すために類縁物質の項を設けて、WAX-HPLC でヘパリ

Table 6 ヘパリンナトリウム 確認試験&純度試験改正

項目	15 局	一部改正 (平成 20 年 7 月 1 日)	一部改正案 (部会段階)
確認試験			WAX-HPLC：ヘパリンナトリウム標準品と溶出時間が一致する
純度試験	(1) 溶状	無色～淡黄色澄明	
	(2) バリウム	混濁しない	
	(3) 総窒素	3.0%以下	
	(4) たんぱく質	10mg/1mLにトリクロロ酢酸添加し白濁を生じない	
	(5) 過硫酸化コンドロイチン硫酸		¹ H-NMR：OSCSのN-アセチル基に由来するシグナルを認めない
	(6) 類縁物質		WAX-HPLC：ヘパリンピーク以降の溶出時間にピークを認めない
	(7) ガラクトサミン		ガラクトサミン

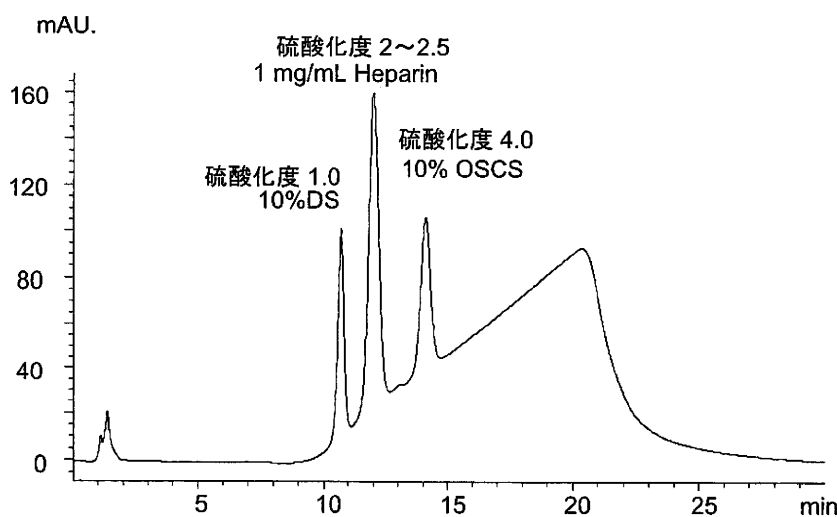


Fig. 2 確認試験用 WAX-HPLC による DS, ヘパリン及び OSCS の分離

以降に硫酸化度の高い多糖類の溶出ピークを認めないとの規定も設けました。

また、ガラクトサミンを純度試験に設定しています。もともとヘパリンはアミノ糖であるグルコサミンをベースにするものです。一方、問題となった過硫酸化コンドロイチン硫酸 (OSCS) はガラクトサミンというアミノ糖を構成糖とする多糖類です。また、混在物質といわれているデルマタン硫酸もガラクトサミンを構成アミノ糖とする多糖類です。このガラクトサミンの量を1%以下と規定することによって、ヘパリンとは異なるガラクトサミンを構成アミノ糖として含む多糖類の許容量を制限しようとしています。

Fig. 2 は、確認試験の一つのパターンです。これは故意に高濃度にしてありますが、デルマタン硫酸とヘパリン、OSCS が分離する条件下でヘパリン標準品に対して保持時間が一致するピークでヘパリンを確認します。

Fig. 3 は、純度試験の類縁物質の例です。OSCS が例

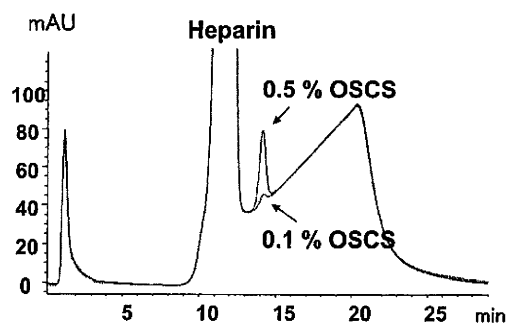


Fig. 3 純度試験用 WAX-HPLC による OSCS の検出

例えば0.1%でも検出できるような条件の WAX-HPLC 法でヘパリン以降のピークを規定することにより、OSCS の混入も含めて、他の硫酸化度の高いものが入ってくることをコントロールしています。

3.2 ヘパリンカルシウム (Table 7)

確認試験では、ヘパリンナトリウム標準品と保持時間

Table 7 ヘパリンカルシウム 確認試験&純度試験改正

項目	15 局第二追補新規収載案	今回の一部改正案
確認試験	(1)	トルイジンブルーO 溶液による呈色
	(2)	WAX-HPLC：ヘパリンナトリウム標準品と溶出時間が一致する
	(3)	Ca の定性反応
純度試験	(1) 溶状	液は澄明である。400 nm における吸光度は 0.05 以下
	(2) 塩化物	0.021%以下
	(3) 重金属	30 ppm 以下
	(4) バリウム	混濁しない
	(5) 残留溶媒	別に規定する
	(6) 総窒素	3.0%以下
	(7) たん白質	混濁を生じない
	(8) 過硫酸化コンドロイチン硫酸	¹ H-NMR：OSCS の N-アセチル基に由来するシグナルを認めない[0.5%以下]
(9) 類縁物質		WAX-HPLC：ヘパリンピーク以降の溶出時間にピークを認めない

が一致することを確認します。純度試験は OSCS に関する ¹H-NMR 及び類縁物質でコントロールしています。

3.3 ヘパリン各条の今後の改正方向

OSCS は製法由来不純物でもなく製品由来不純物でもなく、意図的に添加された異物です。この OSCS を対象とした特別な試験法の設定は、薬局方各条の設定項目としては本来そぐわないと考えられます。

有効性・安全性が長年にわたって立証されてきた医薬品について、その本質及び想定される製法由来不純物あるいは製品由来不純物をコントロールするのが、本来の薬局方の姿です。

OSCS は危機管理方策として日局に設定されましたが、これは原材料段階でのチェックなど、医薬品の品質確保全体戦略の中で日常管理としての合理的対策が講じられるべきものです。したがって、日本薬局方としては時機を見て（1年をめぐりに）日常的管理方策としてのヘパリン各条に改正する方向を目指し、16局追補で対応することを想定しています。

そのためには OSCS のみに注目するのではなく、ヘパリン以外の硫酸化多糖類を広義の類縁物質として包括的にコントロールできるよう、より普遍的で科学的合理性のある試験法を設定したいと考えています。WAX-HPLC 法はその試行策です。必要に応じて更なる改善、あるいはキャピラリー電気泳動法などのより適切な試験法の設定を検討したいと思います。

併せて、高分子多糖類の本質について、どの程度の理化学的な解析が各条に適切かについても検討したいと思います。

4. 平成 23 年 3 月告示予定の第十六改正

第十六改正新規収載予定として現在審議中の生物薬品各条を Table 8 に示します。

生物関連試験法の改定については、ペプチド及びたん白質性医薬品の質量分析を収載する予定です。

4.1 ペプチド及びたん白質性医薬品の質量分析

本試験法は主にペプチド及びたん白質性医薬品の確認試験に用います。従来は例えば分子量は、SDS-PAGE あるいはゲルろ過法で行われていましたが、質量分析法の適用が可能ということからの収載です。

アミノ酸組成・配列の確認にはアミノ酸分析あるいはペプチドマッピングが使われていましたが、これも質量分析法を有効に活用できると考えられます。

参考情報の案としてのペプチド及びたん白質の質量分析の目次を Table 9 に示します。まず原理があり、装置は MS と MS/MS を使うことをベースにしていますので、

Table 8 審議中（新規収載）

生物薬品各条
・ アプロチニン
・ インターフェロンアルファ (NAMALWA)
・ インターフェロンアルファ (NAMALWA)
注射液
・ エポエチンアルファ (遺伝子組換え)
・ エポエチンベータ (遺伝子組換え)
・ ダルテパリンナトリウム
・ ナルトグラスチム (遺伝子組換え)
・ 注射用ナルトグラスチム (遺伝子組換え)
・ フィルグラスチム (遺伝子組換え)
・ レノグラスチム (遺伝子組換え)

Table 9 ペプチド及びたん白質の質量分析
参考情報(案)目次

- ・ 原理
- ・ 装置
 - MS 及び MS/MS の概念図
- ・ 各種測定様式
 - 1. MS
 - 2. MS/MS
- ・ 操作法
 - 1. MS
 - 2. MS/MS
- ・ 確認試験
 - (1) 分子質量の確認
 - (2) アミノ酸配列などの確認
- ・ 用語解説

概念図を記載します。次に各測定様式として MS と MS/MS について解説し、操作法についても MS と MS/MS が記載されます。また、確認試験として、分子質量とアミノ酸配列などの確認に用いることを解説します。

更に質量分析に関わる用語の解説も記載します。

5. 日局審議における今後の課題

一変申請中の品目については、日局の審議を止めるか、一変の審議と並行して日局の審議をするかは意見の分かれるところですが、変更点に応じて個別に対応することにしたと思っています。

後続バイオ製品の問題については、対応する先行バイオ医薬品が既に日局に収載されている場合には、単純たん白質か糖たん白質か、原薬か製剤か等を考慮して、一般的名称、規格及び試験方法の設定策を検討する必要があります。また、日局品との関係をどうするかも検討課題となります。

6. 既収載の見直し

各条ではヒトインスリン製剤を新規収載し、ブタインスリン原薬及び製剤は削除する方向で見直します。

パソプレシン注射液は、従来、脳下垂体後葉から製造されていたため、主に臓器抽出製剤としての規格が設定されていますが、最近では合成品のみが流通している実態を受けて、合成品に対応する理化学的な試験方法を設定したいと考えています。ほぼ新規収載に近い見直しになります。これに伴い、パソプレシン原薬を新規収載したいと考えていますが、例えば試験法を HPLC 法とする場合に、我が国では理化学的な標準品を調達することが困難との問題があります。したがって、USP 標準品の供給の目途が立った段階で原案作成を進めたいと考えて

Table 10 インスリン製剤の見直し

第 15 改正

- インスリン ← ブタ由来
- インスリン製剤 ← ブタ由来
 - インスリン注射液
 - インスリン亜鉛水性懸濁注射液
 - 無晶性インスリン亜鉛水性懸濁注射液
 - 結晶性インスリン亜鉛水性懸濁注射液
 - イソフェンインスリン水性懸濁注射液
 - プロタミンインスリン亜鉛水性懸濁注射液
- ヒトインスリン (遺伝子組換え)

今後の検討

- ヒトインスリン (遺伝子組換え)
- ヒトインスリン製剤
 - ヒトインスリン注射液(仮)
 - ヒトイソフェンインスリン水性懸濁注射液 (仮)
 - 二相性ヒトイソフェンインスリン水性懸濁注射液 (仮)

います。

パルナバリンナトリウムは、15 局に各条が収載されていますが、実際に流通している製品の製法は様々であり、それに対応したより適切な各条とするよう見直す予定です。

7. インスリン製剤の見直し (Table 10)

15 局で収載されているインスリンとインスリン製剤はブタ由来のインスリンですが、現在市場には存在していません。今後の検討としては、既に収載されている遺伝子組換えヒトインスリンをベースに、ヒトインスリン注射液 (仮称)、ヒトイソフェンインスリン水性懸濁注射液 (仮称)、二相性ヒトイソフェンインスリン水性懸濁注射液 (仮称) 等のヒトインスリン製剤を収載したいと考えています。

8. PDG 関連情報 (Table 11)

PDG 調和項目として、六つの生物薬品関連試験法が Stage 6 の段階となっています。更に EP, USP より Glycan Analysis (Glycan Mapping) を加える提案が 2 年ほど前にあり、平成 19 年 5 月にコンセプトペーパーが USP から届きました。生物薬品委員会では、コンセプトペーパーの内容とこの試験法を日局でどのように扱うか、また科学的進歩が急速なのでそのまま調和の方向で進めてよいかを検討し、様々な理由から、当時は調和事項とすることには同意しないこととなりました。

現在は、日局でもこの試験法の作成を検討しつつ、EP, USP の動向を調査することとなっていますので、日本で

Table 11 PDG関連情報：PDG調和項目

	Harmonization item	CP	Stage	Sign-off
B-01	Amino Acid Determination	USP	6	2002. 9.9
B-02	Capillary Electrophoresis	EP	6	2002. 9.10
B-03	Isoelectric Focusing	EP	6	2002. 9.9
B-04	Protein Determination	USP	6	2002. 9.10
B-05	Peptide Mapping	USP	6	2002. 9.10
B-06	Polyacrylamide Gel Electrophoresis	EP	6	1999.10.20
B-	Glycan Analysis			

検討しているものを国際調和のたたき台にすることを考えてもよいと思います。あるいはEP, USPでの考え方が日局の考え方に近いことがわかれば、調和事項とする可能性が出てきます。

9. Q4B 関連情報

2008年11月にQ4B拡大調和項目として、生物薬品関連試験法のうち、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法及びキャピラリー電気泳動法が決定しています。

これを受けてポリアクリルアミドゲル電気泳動法(Annex 10)は2009年6月にStep 2に到達し、現在意見公募中です(2009年10月にStep 4に到達しています)。

キャピラリー電気泳動法は、PDGが作成したQ4B評価文書を既にQ4Bに提出し、Q4Bの中で評価しています(2009年10月にStep 2に到達しています)。

10. 質疑応答

質問 1 マイコプラズマ試験について、第二追補の改正では触れていませんが、PCR法は今後見直しされる可能性がありますでしょうか。

回答 PCR法をどうするかは難しい問題です。詳しく説明しますと、PCR法は日本薬局方がEP, USPより先行して採用しました。その当時、例えばFDAなどはPCR法はDNA断片を検出する方法であって、生きたマイコプラズマを検出する方法ではないとの考えでした。またプライマーに問題があり、プライマー次第でどれだけマイコプラズマがカバーできるのか変わるとの議論もあり、10年前はFDAとEP共にPCR法を局方に収載する考えは全くありませんでした。

現在も基本的には培養法が生きたマイコプラズマを検知する方法ですし、DNA染色法は、筆者は本当の専門家ではありませんが、日本の細胞バンクを管理している方の話では、マイコプラズマ汚染から細胞を管理するにはDNA染色法が一番良いとの意見もあります。

一方で、例えばルーチンで品質コントロールする際に

は、PCR法は非常に手軽に簡単に実施できます。

日本薬局方ではPCR法を公的な方法として認知するが、ただし、従来より実績のある培養法とDNA染色法の二つの方法を実施することが原則で、それでDNA染色法のみで陽性を示したときに、マイコプラズマDNAでないことを確認するという位置づけにしています。なお、日局で示している2段PCR法は感度と特異性に優れた方法であり、プライマーも含めてJISとほぼ同様の方法であること、培養細胞への汚染が知られているマイコプラズマの95%以上を検出できると確認されていること、公的細胞バンクの試験に現在も使用されている実績のある方法であることが確認されています。また、これは参考情報との位置づけで、本文に記載のとおりプライマーも含めて一例を示したものであり、妥当性が立証されれば例示の方法に限定されたものではないことから、今回は特に例示の記載を見直しする必要はないとされました。技術の進歩でプライマーなどが改良され、更に実施しやすい方法あるいはマイコプラズマをより広くカバーできる方法が出てきている、出るということであれば、妥当性を示した上で用いることはもちろん出来ると思います。

先ほど述べましたPCR法ではDNAだけしか見ていない、つまり不活性菌やゲノム断片も検出されるところをどのように克服するかによって利用範囲が広がる、と思います。例えばVero細胞などで少し培養して再度PCR法を実施し、該当するDNAが増えれば生きたDNAを検出していることになると思います。しかし、DNA染色法と比べて時間や労力の面でメリットがあるかどうかを考える必要もあります。

結局、従来の培養法あるいはDNA染色法に対してアドバンテージと合理的な根拠をどれだけ示していけるかによって利用できる程度が変わってくると思います。

実際のルーチンでの様々な管理の中で、PCR法を活用することは全く構わないことと思っています。

PCR法に関して今後の情勢変化によっては、見直しについて委員会の中で議論をしていきたいと考えています。

質問 2 細胞基材に対するマイコプラズマ否定試験における PCR の位置づけについて、ご意見を伺いたいと思います。現行のものでは、培養法と DNA 染色法と PCR 法が 3 法あり、PCR 法は培養法が陰性で DNA 染色法が陽性になったときに、その確認のために使えるといった位置づけになっています。この試験法が導入されたころの PCR は確か非常に曖昧なところがあったと思いますが、現在 PCR は、感度、精度も相当よくなりました。今後再生医療などのように非常にスピーディに結果を出さなければならぬときは PCR に頼ってしまうと思います。そういう意味で PCR をあまり継子扱いせず、第 1 法でどちらでも選択できるような位置づけにした方が、ユーザーとしてはありがたいと思います。

PCR のプライマーを日局の参考情報としてよいと思いますが、EP のようにあまり指定せずに、このようなマイコプラズマを検出できて、しかもこのくらいの数まで検出できるという記載の方がよいと考えます。

回答 PCR を日局あるいは政府のガイドライン的なものに記載したのは、日本が最初ですので継子扱いにすることはありません。ただし、新規収載当時から様々な

議論があり、長所、短所のある検出方法ですので、日局の改正には、慎重にその限界を前提とした判断を下さなければいけないこととなります。ルーチンとして再生医療など様々なケースで PCR でマイコプラズマ否定試験を実施することは運用上構わないと思います。また日本薬局方では、規定された方法より良い方法と検証されていけば使用できることになっているので、そのようなプライマーや方法であることが示されれば、もちろんそれが使えます。設定した当初は、FDA などはけんもほろろで、PCR なんて信用できないと言っていました。培養法や DNA 染色法は昔から行われている方法ですし、特に我が国の衛研のセルバンクなどは DNA 染色法がお勧めの方法との意見でした。

このような状況で現在に至っていますが、薬局方の規定の中でどのように PCR を位置づけるか、より合理的に活用できるかなどについて、使い方、プライマー、あるいは試験条件など様々な要素を勘案しつつ、検討して行きたいと思っています。

文 献

- 1) 厚生労働省：日本薬局方の一部を改正する件，厚生労働省告示第 316 号，平成 19 年 9 月 28 日。
- 2) 厚生労働省：日本薬局方の一部を改正する件，厚生労働省告示第 425 号，平成 21 年 9 月 30 日。