

201132002A

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 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山 口 照 英

平成 24 (2012) 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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山口 照 英

平成24 (2012) 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の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----- 52
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----- 61
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----- 71
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----- 76
内 田 恵 理 子

資料1 EMA GUIDELINE ON THE NON-CLINICAL STUDIES REQUIRED BEFORE
FIRST CLINICAL USE OF GENE THERAPY MEDICINAL PRODUCTS

5. 医薬品一般試験法の国際調和を促進するための研究----- 95
川 西 徹
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----- 107
檜 山 行 雄

資料1 ICHQ8Q9Q10 QIWG 教育研修資料

資料2 ICH Q-IWGによるPoints to Consider

(<http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html>)

資料3 シンシナチ会議の運営委員会への報告

資料4 ベリフィケーションとバリデーシヨンの概念整理資料

資料5 セベリア会議の運営委員会への報告

資料6 DIA・APEC 会議(2011年4月26日ソウル)のプログラム(a)および講演スライド(b)

7. 臨床試験における海外の規制状況の調査研究----- 162
成 川 衛

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表----- 170

Ⅳ. 研究成果の刊行物・別刷

医薬品規制の国際調和の推進による医薬品審査の迅速化のための基盤的研究

研究代表者 山口 照英 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部研究員

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) バイオ医薬品原薬製造におけるデザインスペース設定等の際に想定される課題を抽出し、対応策を検討することを目的としたケーススタディを実施するため、抗体医薬品のトラスツマップをモデルとした実験的製造システムと製造工程を評価可能な各種解析法を確立した。
- 2) 抗体医薬品の生物活性評価法に関する研究として、フローサイトメーターを用いた抗原およびFcγ受容体結合実験系の品質試験法としての有用性を明らかにした。また、抗原発現細胞とエフェクター細胞の架橋を評価するBridging Assay系について、末梢血単核球細胞を用いたADCC活性測定系の代替試験法としての有用性を明らかにした。
- 3) 製造方法の異なるIFN-β1a製剤の力価測定法として、A549細胞を用いた導入レポーター遺伝子の発現促進を指標とした試験法を開発し、従来のウイルスを用いた力価測定よりも簡便な測定法としてその有用性を明らかにした。
- 4) 遺伝子治療薬のヒト初回投与試験までに実施すべき非臨床試験の要件について、各種遺伝子治療薬に共通して必要とされる要件と、ウイルスベクター、非ウイルスベクター、プラスミド、遺伝子導入細胞等の遺伝子治療薬の種類による特有の考慮事項の観点から考察した。
- 5) 医薬品品質管理方策の新しい考え方である製造工程管理について、日米欧各薬局方の取り組みを比較し、各薬局方における製造工程管理の記載の現状、特徴を明らかにするとともに、日本薬局方における今後の記載のあり方について考察した。
- 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ガイドラインの実施作業部会（Implementation Working Group：Q-IWG）の活動に参加し、Quality by Design(QbD)の導入に関して6つのPoints to Consider (PtC)をまとめた。
- 7) 欧米における医薬品の販売承認の更新、条件付き販売承認、市販後臨床試験等の監視のための方策等に関する規制及びその運用状況を調査し、現状を明らかにするとともに、今後の我が国での制度のあり方について考察した。

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	川西 徹	国立医薬品食品衛生研究所 第一室長
石井 明子	国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 第二室長	檜山 行雄	国立医薬品食品衛生研究所 副所長
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	成川 衛	国立医薬品食品衛生研究所 薬品部 客員研究員
内田 恵理子	国立医薬品食品衛生研究所		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
風間 宏美	国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部
加藤 くみ子	国立医薬品食品研究所 薬品部 第四室長

A. 研究目的

抗体医薬や改変タンパク質医薬品など新たなバイオ医薬品の開発や、新規 DDS 製剤、分子標的医薬品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、抗体医薬品を代表とするバイオ医薬品、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 トラスツズマブ発現体の作製

(1) トラスツズマブ発現ベクターの作製

トラスツズマブの H 鎖と L 鎖のアミノ酸配列は、公開されている情報から得た。

シグナルペプチド配列は、ヒト遺伝子のデータベースに対し、トラスツズマブの H 鎖と L 鎖の各 N 末端部分と同じアミノ酸配列をコードする IgG を検索し、同一のアミノ酸配列の上流に連なるシグナルペプチドとして機能することが期待されたアミノ酸配列を抽出し、比較的出現頻度が高い配列を選択した。候補となったシグナルペプチド配列を付した可変領域のアミノ酸配列について、シグナルペプチド切断部位予測ソフトウェア (Genetics) で切断予想部位を確認し、可変領域のアミノ酸配列を確定した。

上記のアミノ酸配列情報を基に可変領域の塩基配列を設計した。発現効率を高めるために、

コーディング領域は、CHO細胞に適したコドンを選択するなど、設計したアミノ酸配列をコードする塩基配列を最適化するために最適化ソフトウェア Gene Optimizer (GENEART) を用いて決定した。また、開始コドンの5'上流には、Kozakのコンセンサス配列を配置した。さらに、作製したDNA断片を発現ベクターにディレクショナルに組込むために、各末端部分にユニークな制限酵素認識部位を追加した。

設計した塩基配列に基づき、合成オリゴヌクレオチドのライゲーション法により、トラスツズマブのH鎖可変領域とL鎖可変領域をコードするDNA断片を調製した。これらのDNA断片は、H鎖の定常領域を持つ発現ベクター pFUSE-CHIg-hG1 及び、L鎖の定常領域を持つ発現ベクター pFUSE2-CLIg-hk1 (Lonza) にそれぞれクローニングした(以下、H鎖発現ベクター及びL鎖発現ベクター)。

(2) トラスツズマブ安定発現株の樹立

トラスツズマブのH鎖発現ベクター及びL鎖発現ベクターをCHO細胞にFuGENE HD (Promega) を用いて共導入した。導入条件は製品の添付文書に従って行った。遺伝子導入後、10%ウシ胎児血清を添加したF12培地(10% F12培地)にゼオシン(100 µg/ml)およびブラストサイジン(10 µg/ml)を添加して10日間セクションし、生じたコロニーからコロニーリフティング法でクローン化した。

各クローンの培養上清を回収し、SPRイムノアッセイでトラスツズマブ濃度を測定した。高発現株については、リクローニングした。

B.1.2 製造工程の開発

(1) 培養工程

予備培養工程

トラスツズマブ発現CHO細胞を、10%ウシ胎児血清(FBS)含有F12培地で10cmディッシュに播種し、コンフルエントになるまで培養した。培養条件は、すべて37°C、5% CO₂

とした。

生産培養工程

生産培養は、無血清培地、Select CHO培地(Becton, Dickinson and Company)あるいはFreeStyle CHO培地(GIBCO)を用いた。

予備培養したものを無血清培地で洗浄した後、10cmディッシュあたり6mLの無血清培地で1週間培養後、上清を回収した。

回収した培養上清は、350 x g、15分間の遠心で clarification した後、ポアサイズ 0.45 µm のフィルターで濾過し、精製工程の出発材料とした。

(2) 精製工程

精製工程 1—濃縮

生産培養の上清を限外濾過膜 Vivaspin 20, 10 kDa MWCO (SARTORIUS) を用いて約 1/10 量まで濃縮した。濃縮液を回収し、遠心で不溶物を除去した。

精製工程 2—プロテイン A アフィニティークロマトグラフィー

精製工程 1 の濃縮液を HiTrap MabSelect カラム(GE Healthcare) に流速 1 mL/min でアプライし、280 nm の吸光度が 0.01 au 以下になるまで PBS で洗浄した。0.1 M Glycine-HCl pH 3.0 で溶出し、2 M Tris-HCl pH 8.5 で pH 7.5 に調整した。さらに、ミリ Q 水で 2.5 mS/cm に調整した。

精製工程 3—陽イオン交換クロマトグラフィー

精製工程 2 の溶液を 50 mM Tris-HCl pH 7.5 で平衡化した HiTrap SP カラム (GE Healthcare) に流速 1 mL/min でアプライし、30分で0.2 M NaClを含むようナリニアグラジエントで溶出した。280 nm の吸光度でモニターし、約 15 分で溶出する主ピークを手動で分取した。

B.1.3 特性解析

(1) SPRイムノアッセイ

トラスツズマブの濃度は、BIAcore 3000

(GE Healthcare) を用いた SPR イムノアッセイで測定した。活性化 CM5 センサーチップに組換えヒト HER2 Fc 融合タンパク質を固定化して用いた。検量線は、市販品のトラスツズマブであるハーセプチン (Roche) 溶液の希釈系列 (18.75~600 µg/mL) を用いて作成した。(その他の条件は川崎分担研究報告参照)

(2) CHO 細胞由来タンパク質の定量

CHO 細胞由来タンパク質は、CHO Host Cell Protein ELISA Kit, 3rd Generation (CYGNUS) を用いて測定した。

(3) CHO 細胞由来 DNA の定量

CHO 細胞由来 DNA は、Alu 配列を標的とした定量 PCR で定量した。反応試薬は、SYBR Green PCR Master Mix (Takara), Alu-F (5'-CCAGGCATTGGTGGCAC-3') 及び Alu-R (5'-AGACAGGGTTTCTCTGT-3') を用いた。qPCR は、変成: 95°C, 1 分, アニーリング: 58°C, 1 分, 伸長反応: 72°C, 1 分で 40 サイクル行い、2nd Derivative Maximum 法で Threshold Cycle (Ct) 値を算出した。検量線の作成は CHO 細胞のゲノム DNA の希釈系列を用いた。

(4) SDS-PAGE

SDS-PAGE は、10~20%アクリルアミドグラジエントゲルを用い、定法に従って行った。ゲルの染色は、クマシーブリアントブルーを用いた。

(5) インタクト解析

ハーセプチン及び本研究で作製したトラスツズマブをそれぞれ水で希釈し、終濃度 1.0 µg/µL となるよう調製し、LC/MS で解析した。液体クロマトグラフィー (LC) は、Paradigm MS4 (Michrom BioResources) を用いた。溶離液は 0.1% ギ酸 (A 溶媒) 及び 90%アセトニトリルを含む 0.1%ギ酸 (B 溶媒) を使用し、流速は 0.6 µL/min に設定した。質量分析 (MS) 装置はナノエレクトロスプレー (nanoESI) イオン源 (AB/MDS Sciex) を接続した Qq-TOF

質量分析装置 (Qstar Elite, AB/MDS Sciex) を使用し、ポジティブイオンモードでデータを取得した。抗体の分析で用いたカラム。グラジエント条件。MS 測定条件以下の通りであった。脱塩カラム: MassPREP Micro desalting column (2.1×5.0 mm, 20 µm, Waters) グラジエント条件: 10-90% B 溶媒 (リニアグラジエント, 20 分間) スキャン範囲: m/z 1,000-4,000 スプレー電圧: 4.0 ekV

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

FcγRIIIa を安定発現する Jurkat 細胞 (Jurkat/ FcγRIIIa) は RPMI1640 に 10%FBS および G418 (終濃度 1 mg/ml) を添加した培地を用い、37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。ヒトバーキットリンパ腫細胞株である Daudi 細胞は RPMI1640 に 20%FBS を添加した培地を用いて同様の条件で培養した。ヒト末梢血単核球細胞 (PBMC) は Cellular Technology 社より購入した。

抗 CD20 抗体リツキシマブおよびその改変体 (G236A/S239D/I332E あるいは L234A/L235A) は、当該遺伝子を発現するベクターを Freestyle CHO-S 細胞 (Invitrogen) に導入し、7 日間培養後の培養上清を HiTrap Protein G HP (GE Healthcare) を用いて精製したものを使用した。

B.2.2 Daudi 細胞を用いた CD20 結合能の評価

Daudi 細胞 (一点あたり 2 x 10⁵ 個) を染色バッファー (PBS + 0.5% BSA, 2 mM EDTA, 0.05% NaN₃) で洗浄した後、リツキシマブを各濃度で添加し 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した後、DyLight488 標識した F(ab')₂ anti-human

IgG Fc 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 (BD) を添加してフローサイトメーター (BD, FACSCantoII) による解析を行った。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 DyLight488 蛍光強度の平均値 (Mean Fluorescent Intensity: MFI) を算出した。

B.2.3 Jurkat/FcγRIIIa 細胞を用いた FcγR 結合能の評価

Jurkat/ FcγRIIIa 細胞 (一点あたり 2×10^5 個) を染色バッファーで洗浄後、リツキシマブを各濃度で添加し 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、DyLight488 標識した F(ab')₂ anti-human IgG F(ab')₂ を添加し、さらに 4°C で 30 分間結合させた。その後、B.2 と同様の手法で生細胞集団の DyLight488 蛍光強度の MFI を算出した。

B.4 PBMC を用いた ADCC 活性測定

標的細胞 Daudi (一点あたり 1×10^4 個) およびエフェクター細胞 PBMC (一点あたり 2×10^5 個) を異なる濃度のリツキシマブ存在下で 4 時間共培養した。死細胞より培養上清中に放出された LDH の活性を Cytotoxicity Detection Kit (Roche) により測定し、標的細胞死の割合を算出した。

B.5 Jurkat/FcγR 細胞を用いた 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 (5×10^4 個) と Jurkat/FcγRIIIa (5×10^5 個) を混合し、各濃度のリツキシマブ存在下で 37°C、60 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 の細胞の割合を算出した。標的細胞のうちエフェクター細胞と架橋された集団の割合を Bridging Index とし、抗体医薬品による両細胞の架橋を評価した。

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

IFN のレポーターアッセイは、Cignal™ ISRE Reporter Assay Kit (SABiosciences) を用いて行った。A549 細胞にレポーター遺伝子 (ISRE-responsive firefly luciferase construct) を Lipofectamine LTX & Plus Reagent (life technologies) を用いて導入した後、天然型及び組換え IFN-β1a 製剤を 2% FCS 含有 DMEM で希釈したものを細胞に添加して 6 時間培養した。細胞を溶解後、firefly luciferase 活性をピッカジーデュアルシーパンジー発光キット (TOYO INK) を用いて測定した。

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

2008 年 5 月に EMA から発出された「GUIDELINE ON THE NON-CLINICAL STUDIES REQUIRED BEFORE FIRST CLINICAL USE OF GENE THERAPY MEDICINAL PRODUCTS」及び遺伝子治療薬に関する指針や医薬品の非臨床試験に関する指針等の資料を基に、遺伝子治療薬のヒト初回試験までに実施すべき非臨床試験の要件について検討した。

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

日本薬局方は日局 15 および日局 16, 欧州薬局方は 7.1, 米国薬局方は USP34-NF29 第一追補 について、製造工程管理に関する記載を調べた。

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（医薬品規制国際調和会議）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、その運用状況を調査した。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文献調査及び訪問調査を行い、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）

本研究で用いたヒト末梢血単核球細胞は、Cellular Technology 社の管理の下、血液提供者からの同意を得た上で採血、連結不可能匿名化されており、本細胞の使用については国立医薬品食品衛生研究所・研究倫理審査委員会による承認を得ている。組換え DNA 実験は、「国立医薬品食品衛生研究所遺伝子組換え実験安全管理規則」に従い、適正に実施した。

C. 研究結果及び考察

C.1 生物薬品の特性・品質解析、品質試験法の

開発に関する研究

化学薬品のみならず、バイオ医薬品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ないデザインスペース等 QbD 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。今後、デザインスペース等を取り入れた QbD 承認申請が増加することを踏まえて、バイオ医薬品製造におけるデザインスペース設定等の課題と対応策を考えておく必要がある。

本研究では、バイオ医薬品原薬製造におけるデザインスペース設定等の際に想定される課題を抽出し、対応策を検討することを目的としたケーススタディを実施するため、実験的製造モデルの構築を行った。モデルバイオ医薬品として、近年開発が急増している抗体医薬品の中から、バイオ後続品や抗体薬物複合体開発が進んでいるトラスツズマブを選択した。

C.1.1 トラスツズマブ発現体の作製

(1) トラスツズマブ発現ベクターの作製

トラスツズマブの H 鎖と L 鎖のアミノ酸配列は公開されているが、シグナルペプチド配列部分は公表されていないため、独自に設計する必要があった。シグナルペプチドは、任意の配列でも機能することが期待されたが、より適合した配列を選択することとし、ヒト遺伝子のデータベースから候補アミノ酸配列を抽出し、シグナルペプチド切断部位予測ソフトウェアで確認した。それらを統合して確定した可変領域のアミノ酸配列を基に、高発現が期待される塩基配列を設計した（図 1-1A, 1-1B）。

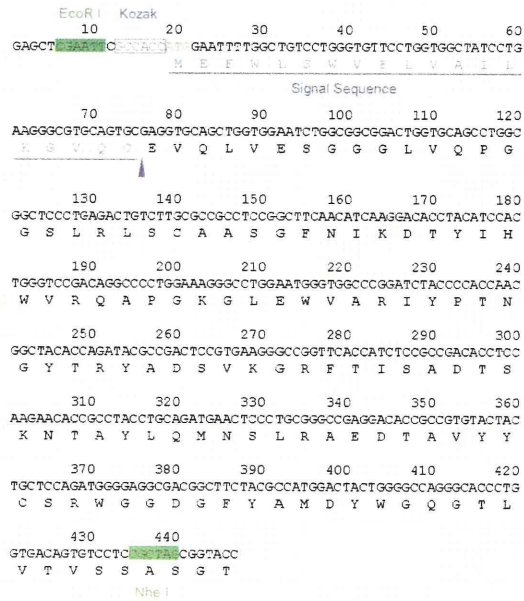


図 1-1A トラスツズマブ H 鎖の可変領域のアミノ酸配列と塩基配列

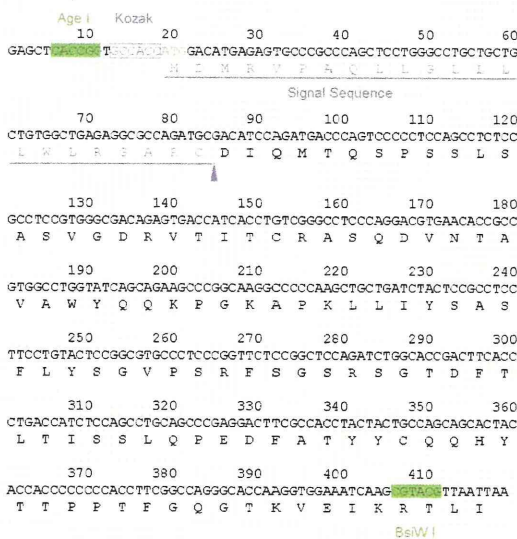


図 1-1B トラスツズマブ L 鎖の可変領域のアミノ酸配列と塩基配列

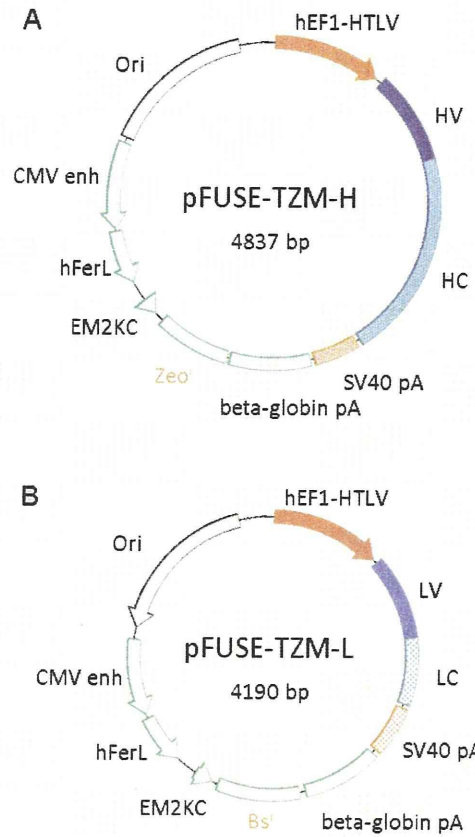


図 1-2 トラスツズマブ H 鎖発現ベクター及び L 鎖発現ベクター

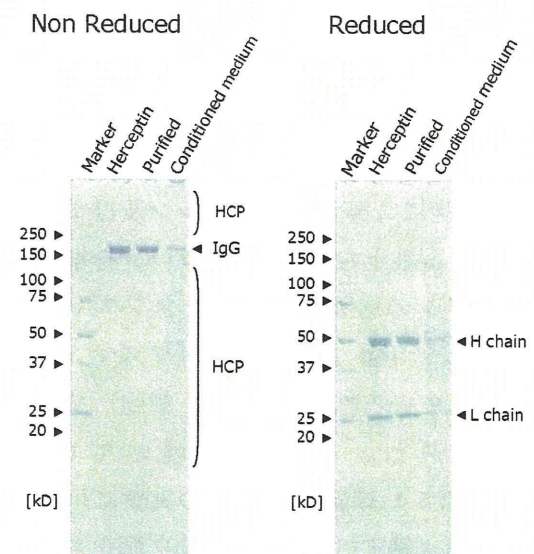


図 1-3 一過性発現で産生させたトラスツズマブの SDS-PAGE

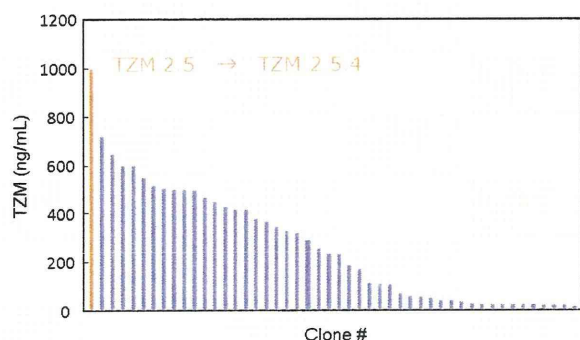


図 1-4 トラスツズマブ発現クローンにおけるトラスツズマブ発現量

合成オリゴヌクレオチド/ライゲーション法により調製した H 鎖および L 鎖の可変領域をコードする DNA 断片を用い、H 鎖発現ベクター (図 1-2A) 及び L 鎖発現ベクター (図 1-2B) を作製した。インサート領域については塩基配列を解析し、設計通りに正しく作製できていることを確認した。さらに、CHO 細胞で一過性発現させ、プロテイン A カラムクロマトグラフィーで精製したトラスツズマブと、市販トラスツズマブ製剤 (ハーセプチン) を SDS-PAGE で比較した結果、期待される分子量を示すタンパク質が産生されることが確認され、作製した発現ベクターが機能することが示された (図 1-3)。

(2) トラスツズマブ安定発現株の作製

H 鎖発現ベクター及び L 鎖発現ベクターを CHO 細胞に共導入し、ゼオシン及びブラストサイジン耐性となった 96 クローンを単離した。各クローンの培養上清のトラスツズマブ濃度を測定した (図 1-4)。トラスツズマブを最も高発現している株 (TZM-2.5 細胞) をリクローニングし、最も高発現していた株 (TZM-2.5.4 細胞) を以下の実験に用いた。TZM-2.5.4 細胞は、無血清培地に順化されていないが、コンフルエントの状態であれば無血清であっても 2~3 週間維持できることが確認され、抗体医薬品製造モデルの生産細胞として有用であると評価された。

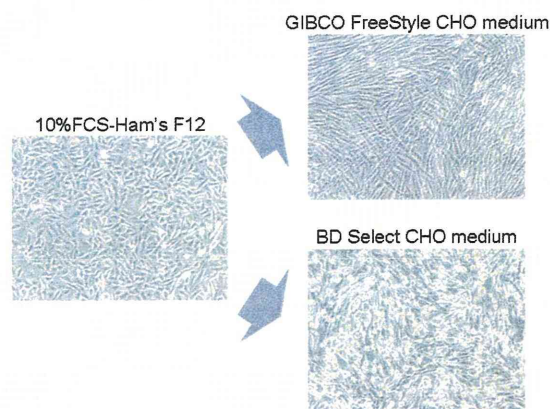


図 1-5 TZM-2.5.4 細胞の無血清培養における細胞像

C.1.2 製造工程の開発

(1) 培養工程

無血清培地として Select CHO 培地及び FreeStyle CHO 培地を用い、TZM-2.5.4 細胞を 1 週間培養した。両培地とも、死滅することなく、維持することができた (図 1-5)。

SPR イムノアッセイで培養上清中のトラスツズマブ濃度を解析した結果、Select CHO 培地で 3.6 mg/L、FreeStyle CHO 培地で 3.0 mg/L となった。より高発現した Select CHO 培地を生産培地として選択した。

(2) 精製工程

精製工程 1-濃縮

限外濾過による濃縮において、トラスツズマブの分子量が約 150 kDa であることを踏まえ 100 kDa MWCO の限外濾過膜を用いていたが、回収率が 70%程度に留まった。10 kDa MWCO に変更した結果、ほぼ 100%回収することが可能となった。

精製工程 2-プロテイン A クロマトグラフィー

プロテイン A カラムクロマトグラフィーには、抗体医薬品の製造に実績がある MabSelect のラボスケールタイプの HiTrap MabSelect カラムを用いることとした。溶出は、0.1 M Glycine-HCl をベースとして、pH4.0 から順次 0.2 ずつ低いものについて順次検討し、100%

溶出される条件として pH 3.0 に決定した。

精製工程 3—陽イオン交換クロマトグラフィー

陽イオン交換クロマトグラフィーは、SP セファロースを採用し、ラボスケールタイプの HiTrap SP カラムを用いることとした。精製工程 2 の溶液を本工程に適用するためには、pH 及び塩濃度を調整することが必要である。ラボスケールでは、透析あるいはゲル濾過による平衡化が一般的であるが、実生産スケールでは、塩基性溶液添加による中和と加水による希釈で調整する方法が一般的であることを踏まえ、本研究では、後者の方法を採用した。

C.1.3 特性解析

(1) トラスツズマブの定量

SPR イムノアッセイでトラスツズマブの濃度を測定する条件を決定し、ハーセプチンを標準物質として検量線を作製した。定量可能範囲は、37.5~600 ng/mL であった (図 1-6)。

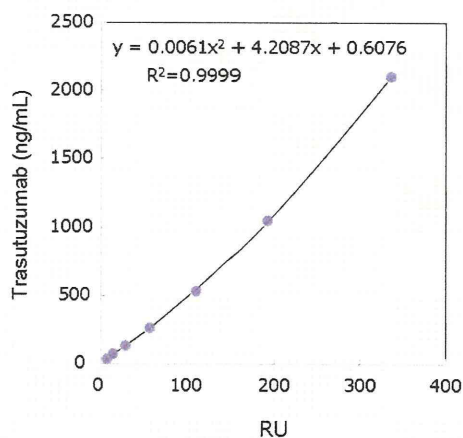


図 1-6 トラスツズマブの検量線

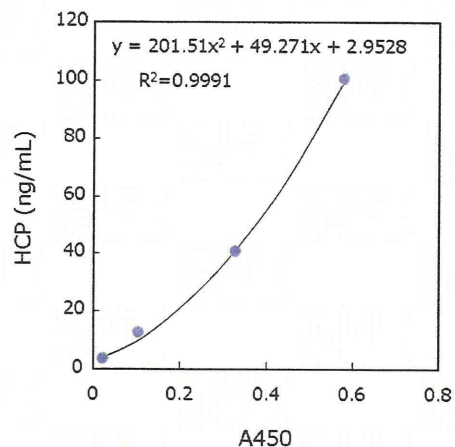


図 1-7 CHO 細胞由来タンパク質の検量線

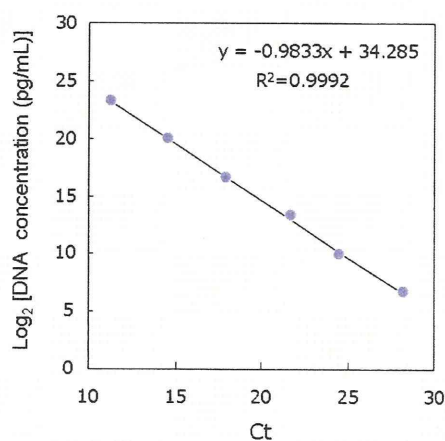


図 1-8 CHO 細胞由来 DNA の検量線

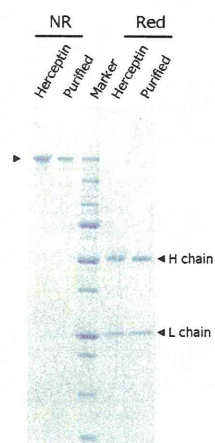


図 1-9 実験的に製造したトラスツズマブと市販トラスツズマブ製剤 (ハーセプチン) の SDS-PAGE による比較

(2) CHO 細胞由来タンパク質の定量

ELISA で CHO 細胞由来タンパク質の濃度を測定するため、CHO 細胞由来タンパク質標準物質として検量線を作製した。定量可能範囲は、12~100 ng/mL であった (図 1-7)。

(3) CHO 細胞由来 DNA の定量

定量 PCR で CHO 細胞由来 DNA の濃度を測定するため、CHO 細胞由来 DNA を用いて検量線を作製した。定量可能範囲は、10 pg/mL~10 μg/ml であった (図 1-8)。

(4) SDS-PAGE

精製工程 2 のプロテイン A クロマトグラフィーで得られたサンプルと市販のトラスツズマブ製剤であるハーセプチンを SDS-PAGE で比較した結果、非還元条件、還元条件ともに、見掛けの分子量は、ハーセプチンと一致していることが確認された (図 1-9)。

(5) 質量測定

ハーセプチンと本研究で製造したトラスツズマブの質量を比較した。図 1-10 に、トラスツ

表 1-1 各糖鎖の存在比率 (%)

	Peak 1	Peak 2	Peak 3	Peak 4	Peak 5
市販品	2.7	29.0	38.3	23.9	6.1
製造品	2.6	47.6	33.3	14.6	1.9

ズマブの LC/MS により得られたデコンボリューションマススペクトルを示した。ハーセプチンと本研究のトラスツズマブで検出された主なアイソフォーム (ピーク 1-5) の質量は一致し、本研究のトラスツズマブのアミノ酸配列及び糖鎖構造は、ハーセプチンと一致することが示唆された。

なお、グリコフォームの分布には違いが観察された。すなわち、ハーセプチンではピーク 3 (G0F/G1F)、本研究のトラスツズマブではピーク 2 (G0F/G0F) が最も多いグリコフォームであると推定された。各ピーク高さの和 (ピーク 1-5 の和) に対する各ピーク高さの比率を求めたところ、ハーセプチンでは G0/G0F, G0F/G0F, G0F/G1F, G0F/G2F (または G1F/G1F), G1F/G2F でそれぞれ 3, 29, 38, 24, 6%, 本研究のトラスツズマブでは 3, 48, 33, 15, 2% であった (表 1-1)。

C.1.4 製造工程の評価

本研究で構築した製造工程の流れを図 1-11 にまとめた。100 mL スケールの培養で得た上清を 5 mL まで濃縮した。これを HiTrap MabSelect カラムにアプライし、0.1 M Glycine-HCl pH 3.0 で溶出した (図 1-12)。さらに、pH と電気伝導度を調整後、HiTrap SP カラムにアプライし、塩化ナトリウムのリニアグラジエントで溶出した (図 1-13)。

表 1-2 に各精製工程における、トラスツズマブの回収率、宿主由来タンパク質、宿主由来 DNA の除去状況を示した。

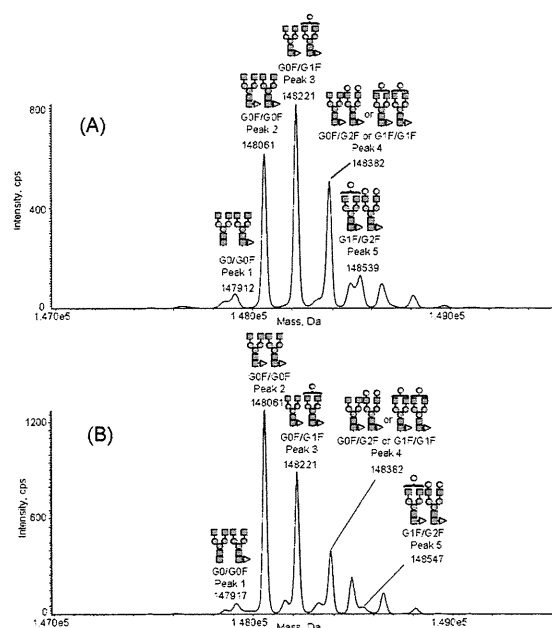


図 1-10 LC/MS により得られたトラスツズマブのデコンボリューションマススペクトル

(A), ハーセプチン; (B), 本研究のトラスツズマブ

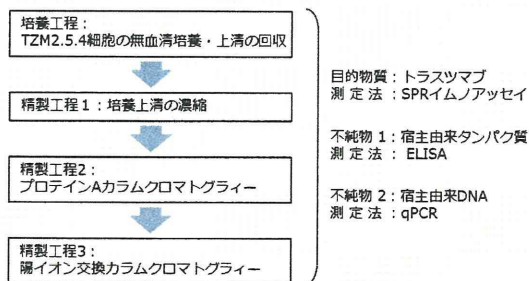


図 1-11 トラスツズマブの実験的製造工程フロー

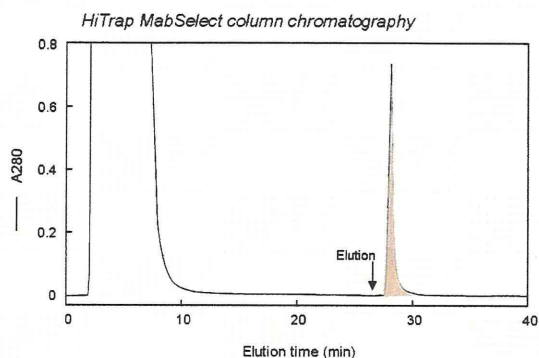


図 1-12 プロテイン A カラムクロマトグラフィー

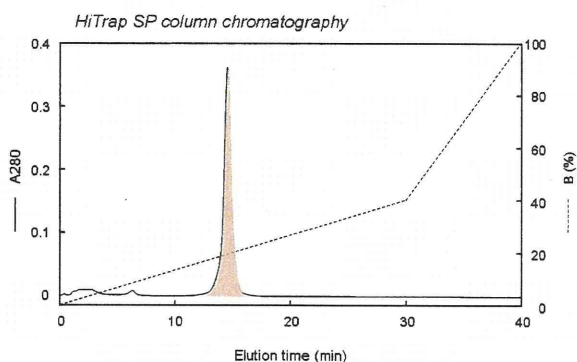


図 1-13 陽イオン交換カラムクロマトグラフィー

表 1-2 精製工程における目的物質と不純物の推移

	TZM [μg]	Recovery [%]	HCP [ng]	DNA [ng]
Harvest	540	100	6,100,000	927,000
MabSelect	119	22	480	16
SP	73	13	145	5

C.2 先端バイオ医薬品の生物学的試験法に関する研究

現在までに日米欧で 34 品目の抗体医薬品、および抗体 Fc 領域と他のタンパク質やペプチドを融合させた 7 品目の Fc 融合タンパク質医薬品が承認されている。現在も多くの抗体医薬品が臨床開発段階にあり、今後も承認品目数の大幅な増加が見込まれている。最近では特に有効性・安全性の向上を目的とした改変型抗体医薬品の開発が活発化しており、本邦では 2012 年 3 月に、糖鎖改変技術により抗腫瘍活性を増強した抗体医薬品モガムリズマブが世界に先駆けて承認されている。

抗体医薬品は、抗原結合を担う Fab 領域とエフェクター活性を担う 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による標的分子の中和・阻害活性に加え、ナチュラルキラー細胞 (NK 細胞) 等のエフェクター細胞上の Fc γ 受容体を介した抗体依存性細胞傷害活性 (ADCC 活性) および補体を介した補体依存性細胞傷害活性 (CDC 活性) が挙げられる。抗腫瘍活性を目的とする抗体医薬品においては、これらの細胞傷害活性の発揮による腫瘍細胞死の誘導が主要な作用メカニズムの一つとなっており、細胞傷害活性の増強を目的とした Fc 領域改変型抗体医薬品の開発が進展している。先に述べたモガムリズマブは、抗体 Fc 領域に付加する糖鎖修飾のうち、還元末端に付加されるフコースを除去することにより抗体医薬品の ADCC 活性を増強する技術を用いて生産されており、有効性の向上を目的とした改変型抗体医薬品の代表的な一例である。この他にも同様の糖鎖改変技術を利用した抗体医薬品や、アミノ酸置換により Fc γ 受容体親和性を増強した抗体医薬品の開発が進められており、何れも高 ADCC 活性を有する抗腫瘍抗体医薬品として注目されている。

抗体医薬品のように複雑な高次構造からな

り、分子不均一性を有する糖タンパク質医薬品においては、理化学試験のみでは高次構造の完全性を確認できない場合がある。このため、抗体医薬品の品質試験では、タンパク質の高次構造と機能を評価可能な生物活性評価が必要とされている。標的タンパク質の中和・阻害活性を目的とする抗体医薬品の生物活性評価系としては、主に抗原結合能を評価する目的で抗原タンパク質を固相化した ELISA 法が用いられている。一方で、複数の膜貫通領域を有する膜タンパク質等を抗原とする場合には、抗原調製が困難となる場合があり、より生理的な条件下での結合活性を評価可能な手法として、抗原発現細胞への抗体医薬品の結合をフローサイトメーター等により測定する Cell-based binding assay も抗原結合能評価系の一つとして考えられる。また近年では国際的に、各々の抗体医薬品の作用メカニズム (MOA: Mechanism of Action) に基づいた生物活性評価系が求められる傾向にあり、MOA を反映した Cell-based assay の確立が課題となっている。特に ADCC 活性評価系については、改変型抗体医薬品の開発の進展が著しいこともあり、頑健な活性評価系の確立が急務となっている。

本年度は、4 回膜貫通型タンパク質である CD20 を標的とする抗体医薬品リツキシマブをモデルとして選択し、リツキシマブ、及び、Fcγ受容体親和性を増強あるいは減弱したリツキシマブ改変体を作製して、フローサイトメーターを用いた Cell-based binding assay による抗原および Fcγ受容体結合能評価系の有用性について検討した。また、既存の ADCC 活性測定系の代替法としての Bridging assay 系の適応可能性について検討を行った。

C.2.1 Cell-based binding assay による抗原結合能の評価

抗 CD20 抗体リツキシマブ野生型、Fcγ受容

体高親和性改変体 (mutant-1: G236A/S239D/I332E)、Fcγ受容体低親和性改変体 (mutant-2: L234A/L235A) を作製し、CD20 を高発現するパーキットリンパ腫細胞株である Daudi 細胞に対する結合実験を行った。野生型、高親和性改変体 (mutant-1)、低親和性改変体 (mutant-2) の何れの抗体においても添加濃度に依存した結合の増加が認められ、その見かけの解離定数 (Kd 値) は約 5.8 nM (0.84 μg/ml) であった (図 2-1 A)。

医薬品医療機器総合機構から公開されているリツキシマブ®の審査報告書では、¹²⁵I 標識リツキシマブを用いた SB 細胞 (ヒト由来 CD20 陽性細胞) への結合実験の結果が示されており、その見かけの Kd 値は 5.2 nM とされている。このことは本研究で用いた非標識抗体と蛍光標識二次抗体を用いたフローサイトメトリーによる結合実験により、放射標識抗体を用いた従来の結合実験と同様に抗原結合能の評価が可能であることを示している。放射性物質による抗体医薬品の直接標識は抗体の機能に影響を及ぼす可能性があること、放射標識した抗体を使用するには実験室の制約があることなどを考慮すると、本研究で用いた蛍光標識二次抗体とフローサイトメーターを用いた結合実験系の有用性は高いと考えられる。

C.2.2 Cell-based binding assay による Fcγ受容体結合能の評価

リツキシマブとその改変体について、Jurkat/FcγRIIIa 細胞を用いて Fcγ受容体に対する結合実験を行った。高親和性改変体 (mutant-1) で野生型に比べて著しい結合能の増加が認められ、低親和性改変体 (mutant-2) では結合能の減弱が観察されたことから、本実験系により Fc 領域の機能の差異を検出可能であることが示された (図 2-1 B)。

しかし、今回の実験条件では結合量が飽和に

達しなかったため、最大結合量 (Bmax) を算出することができず、Kd 値での結合性の比較は不可能であった。抗原に結合していない抗体の FcγRIIIa および FcγRIIIa に対する結合親和性は数百 nM (数十 μg/ml) と報告されており⁴⁾、本実験系で Kd 値を算出するにはより高濃度の抗体の添加が必要である。細胞を用いた結合実験系では、実験に要する試料の容量等を考慮すると Kd 値の算出に必要な高濃度の抗体を添加することは現実的ではなく、Fcγ受容体親和性を定量的に評価する場合には、速度論的解析が可能な表面プラズモン共鳴 (SPR) 法等の利用を検討する必要があると考えられた。

C.2.3 PBMC を用いた ADCC 活性測定

PBMC をエフェクター細胞として Daudi 細胞に対するリツキシマブ野生型、高親和性改変体 (mutant-1)、低親和性改変体 (mutant-2) の ADCC 活性を測定した結果、野生型および高親和性改変体 (mutant-1) において、添加抗体濃度に依存した細胞傷害活性の増強が認められ、ともに 1 μg/ml において約 60% の細胞死が検出された (図 2-2)。この際の 50% 効果濃度 (EC50) は野生型 22.9 ng/ml に対し、高親和性改変体 (mutant-1) では 11.3 ng/ml であり、EC50 の比から高親和性改変体 (mutant-1) は野生型に比べて約 2 倍の ADCC 活性を有することが示された。低親和性改変体 (mutant-2) の ADCC 活性はこれらに比べて低く、EC50 は算出不可能であった。

ここで用いた PBMC をエフェクター細胞とする方法は、ADCC 活性測定法として一般的に用いられている方法である。抗原結合に依存した Fcγ受容体の活性化を反映した結果が得られるが、PBMC のドナーやロットによる反応性の違いや再現性の低さが問題となり、品質試験法としては適していない。本実験結果も、複数ロットの PBMC を検討した中で反応性の高いロットを用いて取得したものであり、同一

ロットを用いても最大活性等の反応性については再現性が高くなかった。

そこで、次に、エフェクター細胞として Fcγ受容体発現細胞を用いて、標的細胞とエフェクター細胞の架橋を指標に、抗原結合に依存した Fcγ受容体結合を評価する Bridging assay 法について検討した。

C.2.4 Fcγ受容体発現細胞株を用いた Bridging Assay

リツキシマブ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 Daudi 細胞を、エフェクター細胞として Jurkat/FcγRIIIa 細胞を用い、Bridging Assay を行った (図 2-3)。野生型リツキシマブでは添加濃度の増加に伴い、両細胞の架橋の亢進が認められ、最大で 80% 程度の標的細胞の架橋が観察された (EC50 = 39.7 ng/ml)。また高親和性改変体 (mutant-1) は野生型に比べてより強い細胞架橋能を示した (EC50 = 23.1 ng/ml)。野生型と高親和性改変体 (mutant-1) の EC50 比は 1.7 であり、PBMC を用いた ADCC 活性測定系で算出された力価比と比較的近い値を示したことから、Bridging Assay が ADCC 活性測定の代替試験法として有用である可能性が示された。

一方、低親和性改変体 (mutant-2) および陰性コントロールとして用いたポリクローナル hIgG では顕著な架橋の亢進は認められなかった。低親和性改変体 (mutant-2) は PBMC を用いた ADCC 活性測定系では高濃度で細胞傷害活性を示していたものである。リツキシマブは CD20 発現細胞に対してアゴニスト活性を発揮し、アポトシスを誘導することが知られている。標的細胞死を検出する測定系では、エフェクター細胞を介した細胞傷害活性に加えて、このようなアゴニスト活性も寄与するため、Bridging Assay とは異なる結果が得られたと考えられる。したがって、抗体医薬品の Fc 領

域の機能を評価するという観点では、抗原結合に依存した Fc γ 受容体との結合のみを評価可能であるという点で Bridging Assay がより適切な評価系であると考えられた。

C.2.5 考察

本研究では、フローサイトメトリーを用いた Cell-based binding assay 及び Bridging assay 系を構築し、リツキシマブとリツキシマブ改変体をモデルとした実験により、その有用性を検証した。構築した Cell-based binding assay は、細胞表面の膜タンパクを抗原とする抗体医薬品の抗原結合能の評価や、種々の抗体医薬品の Fc γ 受容体結合能の評価に有用と考えられた。また、Bridging assay は、末梢血単核球を用いる従来の ADCC 活性測定法の代替法として、抗原結合に依存した Fc γ 受容体結合能の評価に有用な方法であると考えられた。

以下に、抗体医薬品の品質評価におけるこれらの試験法の位置づけと役割、及び、細胞を用いた結合性試験を品質試験として設定する際の留意事項を考察する。

(1) Cell-based binding assay

近年開発の進展の著しいバイオ医薬品の中でも抗体医薬品はその大部分を占め、様々な抗原タンパク質を標的とする抗体医薬品の開発が進められている。特に抗腫瘍活性を目的とした抗体医薬品の開発は顕著であり、これまでの化学薬品では治療が困難であった様々な腫瘍に対する治療薬として大きな期待が寄せられている。これらの抗腫瘍抗体医薬品の多くは標的腫瘍細胞表面に特異的あるいは過剰に存在する膜タンパク質を標的としており、受容体シグナルの阻害やエフェクター細胞等を介した細胞傷害活性が主要な薬理メカニズムとして知られている。

抗体医薬品の品質確保のためには、その作用メカニズムに基づいた適切な生物活性試験を

設定することが重要である。サイトカイン等の可溶性抗原の中和を目的とする抗体医薬品では、抗原結合能と中和活性の相関性を確認した上で、生物活性試験として抗原結合実験が設定されることが多い。この場合、可溶性抗原の組換えタンパク質を固相化した ELISA 等が用いられるのが一般的である。また、細胞膜上の受容体タンパク質を標的とし、リガンド結合による受容体シグナル活性化の阻害を目的とした抗体医薬品においても、受容体シグナルの阻害活性と抗原結合能の相関関係が示されれば、可溶性抗原の場合と同様に ELISA 等の結合実験を生物活性評価法として設定することが可能であると考えられる。

しかしながら、複数膜貫通型タンパク質を抗原とする場合には、生理的条件下での構造を保持した組換えタンパク質の調製が困難なことから、抗体のエピトープとなるペプチド断片等が結合実験に用いられ、必ずしも細胞膜上での抗原-抗体結合能を評価できないという問題が生じることも想定される。このような場合には、標的タンパク質を発現する細胞を用いた Cell-based binding assay が有用な選択肢の一つとして挙げられる。

一方、細胞傷害活性を作用メカニズムとする抗体医薬品では抗原結合能に加え、Fc 領域を介した補体や Fc γ 受容体といったエフェクタータンパク質との結合についても評価する必要がある。生産細胞の培養条件や精製方法などにより変動しうる抗体 Fc 領域の糖鎖構造が、これらエフェクタータンパク質との結合能に影響を及ぼすことが知られており、工程評価の面でも Fc 領域を介した生物活性の評価系の有用性は高い。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⁵⁾、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評価できない例があること⁶⁾などから、Fc γ 受容体との結合実験においても

Cell-based binding assay の適応が妥当であると考えられる。

(2) Bridging assay

抗腫瘍効果を持つ抗体医薬品の作用メカニズムの一つである ADCC 活性は、抗体の抗原への結合、それに伴う Fc γ 受容体との結合（標的細胞とエフェクター細胞の架橋）、Fc γ 受容体の活性化によるエフェクター細胞内のシグナル伝達の亢進という多段階の反応からなる。本実験でも示されたように、抗原と結合していない抗体の Fc γ RIIIa および Fc γ RIIIa に対する結合親和性は低く（図 1 B）、抗原と結合することではじめて強い結合能を示す（図 3）。これによりエフェクター細胞上の Fc γ 受容体が活性化され、抗原発現細胞に対する細胞傷害活性が発揮される。

このような作用機構を考えると、細胞傷害活性を有する抗体医薬品の品質評価においては、抗原結合に依存した Fc 領域の Fc γ 受容体への結合の評価が重要となる。組換えタンパク質を用いた ELISA 法や SPR 法では、標的細胞膜上に局在する抗原と結合した抗体の機能を評価することは困難なため、細胞膜上に発現する抗原への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、Cell-based binding assay を応用した Bridging Assay が有用と考えられる。

(3) 細胞を用いた結合性試験設定における留意事項

本研究で用いた Cell-based binding assay や Bridging Assay のような細胞を用いた結合性試験では、抗原や Fc γ 受容体タンパク質の調製が不要であり、より生理的条件下に近い環境で抗体医薬品の結合活性を評価可能であるという利点を有する。一方で、抗原あるいは Fc γ 受容体タンパク質の発現量など、実験に用いる細胞の状態の変化が試験結果に影響を及ぼす

可能性が考えられ、その管理には十分な注意が必要である。実験に用いる細胞の一定の品質を保つためには、医薬品生産に用いられる細胞基材の管理の考え方が参考になる。すなわち、抗原や受容体タンパク質の発現量、発現の安定性等、試験結果に影響する細胞の特性を十分に解析して、試験に適した細胞株を樹立し、セル・バンク・システムにより細胞を管理する。試験に使用可能な継代数を設定することに加え、実際に試験に用いる細胞の状態（継代後の日数、細胞密度等）を一定に保つことにより、より頑健な試験系の構築が可能であろう。

C.3 製造方法の異なるバイオ医薬品の有効性の評価試験方法に関する研究

組換え DNA 技術を応用したタンパク質医薬品は 1980 年代に始めて承認されて以来、多くのタンパク質医薬品が開発・承認されている。現在、これらのタンパク質医薬品は特許切れを迎えることとなり、それらのバイオ後発品の開発が活発に行われつつある。実際、我が国においても成長ホルモンとエリスロポエチンのバイオ後続品が承認され、複数の G-CSF においてバイオ後続品の承認申請が行なわれている。

タンパク質医薬品は化学薬品に比べて構造が複雑で、様々な翻訳後修飾を受けるため、製造方法が異なる場合、一次構造は同じであっても翻訳後修飾や高次構造が同一であるかどうかは不明である。したがって、臨床試験を行う前に、有効性評価の一環として生物活性を測定し、バイオ後続品と先発品と同等/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されている。

再発寛解性多発性硬化症及び C 型肝炎の治療

療薬として用いられている IFN- β 1a はバイオ後続品の有力な候補の一つである。

IFN- β の力価はウイルスを用いた細胞変性効果アッセイに基づき力価が設定される。本法は高感度であり、臨床効果に関与するシグナル伝達系の阻害を反映できる。しかし、用いるセルライン及びウイルスが研究者により異なるため、研究室間における結果の比較が困難であること、操作が煩雑であり、ウイルスを取り扱うため特別の施設が必要であるなどの欠点もある。

そこで、本研究ではより簡便な IFN- β の力価測定法として、A549 細胞に導入した interferon stimulated response element (ISLE) を持つレポーター遺伝子の発現促進を指標とした試験法を開発し、その有用性について検討した。

(1) IFN- β 1a 製剤のレポーターアッセイによる評価

天然型及び組換え型の IFN- β 1a 製剤 3 種類について、レポーターアッセイを行った。IFN- β 1a 製剤は 0.1 IU/ml から表示単位依存的に Firely Luciferase 活性を増加させ 10~100IU/ml で飽和に達し、最大で 4.9~7.4 倍活性が増大した(図 3)。各 IFN- β 1a 製剤で表示単位依存性に若干の違いが見られた。IFN- β 1a 製剤 1 では 1 IU/ml において 2.9 倍活性が増加し、10 IU/ml で最大に達し 7.4 倍活性が増加した。IFN- β 1a 製剤 2 では 1 IU/ml において 3.4 倍活性が増加し、10 IU/ml で最大に達し 5.1 倍活性が増加した。IFN- β 1a 製剤 3 では 1 IU/ml 及び 10 IU/ml においてそれぞれ 1.9 倍及び 4.0 倍活性が増加し、100 IU/ml で最大に達し 5.9 倍活性が増加した。各 IFN- β 1a 製剤で表示単位依存性が若干異なる理由については明らかではないが、細胞変性効果アッセイに比べて高感度及び高精度で測定できることによるのかもしれない。

基礎的検討を行なっている過程において以下の点に注意する必要があるようになった。1 番目の点は培地の選択である。コントロールと IFN- β 1a 製剤添加における活性の違いをより顕著にするために、無血清培養を試みた。その結果、レポーター遺伝子の導入操作によりかなりの細胞が死滅することにより活性は低くそのばらつきも大きかった。1~2%FBS を培地に加えると、これらの問題点は改善されると共に IFN- β 1a 製剤に対する高い反応性も示された。2 番目の点は IFN- β 1a の反応時間である。IFN- β 1a 製剤添加 24 時間後活性を測定したところコントロールと IFN- β 1a 製剤を添加したもので活性の違いはみられなかった。これは恐らく 24 時間では IFN- β 1a の有無にかかわらず活性が飽和に達したためと考えられる。この点は反応時間を 6 時間に設定することにより改善された。3 番目の点は細胞を溶解する条件である。ミキシングのみを用いて細胞を溶解させると活性のばらつきが大きかった。顕微鏡で観察すると細胞が十分溶解されていなかったため、この原因は基質と酵素の反応性の低下によることが示された。この点はさらに超音波処理を行なうことにより改善された。

(2) 考察

IFN- β 1a 製剤の力価測定法として細胞変性効果アッセイとの相関が示されている方法が 3 種類ある。最初の二つは A431 細胞を用いて IFN- β 1a による MxA タンパク質あるいは mRNA レベルの増加を測定するものである。もう一つは HuH7 細胞を用いて導入されたレポーター遺伝子の IFN- β 1a による発現増加を測定するものである。前者と本法を比較すると同様な表示単位依存性を示し同等な結果が得られた。本法と比較すると、MxA タンパク質は ELISA により MxA mRNA レベルは RNA を抽出後 RT-PCR により測定する必要がある。本法では細胞を溶解して基質と反応させるだけで測定可能であり、より