

について) ベリファイせねばならない。このベリフィケーションには、スケール依存の工程パラメータについて CQA の監視・試験が含まれるべきであるとしている。又、異なるスケールへの適用性についてリスクベースの取り組みが推奨されるとしている。

デザインスペースの申請添付資料への記載(6.3)の項では、申請資料への記載はさまざまな様式が可能であり、Q8R(2)には様式と記載場所が例示されている。申請書類に含まれるべき要点として、critical パラメータ、その他関連のパラメータを伴うデザインスペースの記載、原材料特性などの入力変数と CQA との関係、さらにサポートデータが上げられている。デザインスペースのライフサイクルマネジメント(6.4)の項では、デザインスペースの運営に関する管理戦略は生産サイトの能力に依存する。技術移転時、残りのライフサイクルを通じ知識の共有が求められる。具体的な知識が説明されている。

#### (7)プロセスバリデーションと連続的プロセスベリフィケーション(CPV)

本 PtC で示す考慮点は、ICHQ8,Q9, Q10 の原則に基づく(伝統的なプロセスバリデーションに代わる)アプローチをサポートするためのものであり、連続的プロセスベリフィケーションを含めた、製品ライフサイクルを通じた全体的なプロセスバリデーションを記述する。プロセスバリデーションの目的は製造工程が既定の品質基準を満たす製品を一貫して生産できることを再確認することであり、具体的な手法として伝統的なもの、連続的プロセスベリフィケーション、およびこの二つの組み合わせなどがある。この章は一般的考慮点(7.1)、連続的プロセスベリフィケーション(CPV)(7.2)、医薬品品質システム(7.3)の3つの項から成り立っている。

一般的考慮点(7.1)では、伝統的なプロセス

バリデーションは、生産開始あるいは変更時に、(通常の)管理戦略により多くのサンプリングなどを加えた、一定の限定的な数のバッチ生産に注力していた。この(伝統的な)手法は、より進んだ製剤開発を行った場合においても採用は許容されるとしている。多くの場合、商用生産開始後新たな知識が得られ、それに基づき管理戦略の修正、製造プロセスの改良が行われ、その結果、プロセスバリデーションにインパクトを与える。このことからライフサイクルを通じたプロセスバリデーションの重要性が認識できる。プロセスバリデーションの計画はリスクに基づいたアプローチを使用すべきである。

連続的プロセスベリフィケーション(CPV)(7.2)の項では、CPV は製造工程の連続的モニター・評価を包含するプロセスバリデーションへのアプローチであると ICHQ8 ガイドラインに記載がある。CPV は商用生産開始時、日常の商用生産に使用可能であり、製造工程の変更評価を推進する。CPV の利点として、1. 商用生産開始時の限定的なバッチ生産によるアプローチから、より多くのバッチ数(あるいはすべてのバッチ)より進んだ品質保証へのシフト、2. 堅牢な製造工程と製品品質モニターの基礎になることにより、製品・工程理解および継続的改善の機会の推進をする。3. 製造工程のトラブル・傾向の早期発見。4. 変更のリアルタイムの評価、その結果変更マネジメントの推進。5. より多いデータ数による統計的パワーの増加。6. 連続製造プロセスの評価。7. デザインスペースが設定されている場合の(商用スケールの)ベリフィケーションへの貢献があげられている。

医薬品品質システム(7.3)は製品ライフサイクルの段階間をつなぎ、その結果プロセスバリデーションのライフサイクルアプローチを推進する。リスクアセスメントは、プロセスバリデーション計画の開発および変更の評価にも役立つ。

以上のように、PtC の作成は完結した。会議半ばにおいては、バリデーションとベリフィケーションの概念に関してメンバー間で認識の違いが見えたため、対比の説明資料を示し認識の相互理解を試みた。この対比資料は、プロセスバリデーション、分析バリデーション、洗浄バリデーション、無菌操作のバリデーション、治験薬 GMP などの領域で用いられている用語・概念を筆者が集約したものである。必ずしも全体が一貫していないものの、それぞれの項はおおよそ正しいものと思われる。

本セベリア会議では、QIWIW 完結後に、ICH において取り込むべき課題として規格試験設定ガイドライン (Q6) の改訂などをあげた。

#### C.6.4 考察

QbD の導入に関して6つのPtCがまとめられた。それぞれのテーマに関しての重要点が記述されていることは間違いないと考える。企業、行政にかかわらず、全体を見渡す立場にいる者にとっては有益な文書であろうと思われる。一方、分業が行われる企業の専門家の立場に立って考えると、新たなタスク (例えば、RTRT の開発、新製品のプロセスバリデーションの手法開発・実行) を行うためには、ガイドライン、Q&A、研修資料、PtC すべてを読み込み、課題 (タスク) を中心にした個別の組み立てが必要となる。現在、QbD を適用した企業数は世界的に見ておよそ 10 程度ではないだろうか。事例研究を通じ、より高度な品質管理が進展することが望まれる。又、デザインスペースの開発(6.1)では、既存の製品に開発する折には既存の生産実績データを多変量解析を通じ用いることが出来るとしている。日本 PDA 製薬学会の技術教育委員会からは、既存の製品に多変量解析を用いた事例が報告されている。この手順は新規開発の医薬品にも同様に有用であるとしている。

## C.7 臨床試験における海外の規制状況の調査研究

承認審査、市販後調査を含め医薬品規制の国際調和を推進することにより、医薬品のグローバルな開発環境の整備及び安全確保体制を確立するための調査研究の一環として、欧米における販売承認の更新、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、将来の我が国での制度のあり方について検討した。

### C.7.1. 欧州における販売承認の更新制度

#### (1) 制度の概要

欧州における販売承認の更新制度の下では、原則として全ての医薬品の販売承認は初回承認から 5 年間有効となり、承認から 5 年後に、承認保持者 (企業) からの申請に基づき、EMA (European Medicines Agency : 欧州医薬品庁) によるリスク・ベネフィットの再評価を経て、販売承認が更新される。通常、ひとたび更新されると、その後の販売承認の期限はなくなるが、市販後の安全監視の観点から必要と判断される場合には、一度に限り再度 5 年の期限を付すことができるとされている。「条件付き販売承認」(C.7.2 参照) に該当する品目については、この更新が 1 年ごとに必要となる。

なお、申請者は、更新申請に際して、1 製品ごとに 12,500 ユーロの手数料を支払う。

(EC 規則 No.726/2004 第 14 条 1-3 1))

更新に関する審査の結果、①通常の使用状況において危険がある場合、②有効性がない場合、③品質が不良な場合、④申請書類が不正確である場合には、販売承認の一時停止又は取消しを行うとされている。現行の更新制度は 2005 年 11 月から施行されたものである。(EC 指令 2001/83 第 116 条 2))

#### (2) 制度の運用状況

2011 年は、CHMP (Committee for

Medicinal Products for Human Use : 人用医薬品委員会)において、52 品目について販売承認の更新が了承された。うち 20 品目については 5 年後に再度の更新が必要と判断されている (下表参照)。2010 年は、更新品目 47 のうち再更新が必要とされたものは 10 であり、再更新が必要とされた品目数は倍増した。

2011 年	更新が了承された品目数		
	合計	期限なし	5 年後に再更新
1 月	4	1	3
2 月	5	3	2
3 月	9	6	3
4 月	3 *	2	1
5 月	8	4	4
6 月	2	1	1
7 月	5	3	2
8 月	—	—	—
9 月	5	4	1
10 月	6	4	2
11 月	5	4	1
12 月	0	0	0
合計	52	32	20

\* この他 Avaglim (rosiglitazone/glimepiride) については更新が否決された。

EMA は、更新手続きが終了すると、当該製品の EPAR (European Public Assessment Report : 審査報告書) を改訂 (更新に関する CHMP の結論の簡単な記述を追加) し、公表する。また、販売承認の一時停止又は更新否決となった製品については、その理由を記した文書を公表する。

例えば、Champix (varenicline tartrate) は販売承認の更新が了承されたが、精神神経系 (うつ、自殺念慮など) 及び心血管系リスクの評価のため、年1回のPSURの提出と併せ、5年後に再度の更新申請が必要と判断された。

## C.7.2 欧州における条件付き販売承認制度

著しく衰弱性の疾患又は生命を脅かす疾患に使用される薬剤、公衆衛生への脅威に対応すべく緊急な状況で使われる薬剤又はオーファンドラッグについて、通常よりも不完全な承認申請データ (特に臨床試験データ) で承認をせざるを得ない場合に、特定の条件を付して販売承認を行う制度である。この場合の条件とは、進行中の臨床試験又は新たに実施する臨床試験によってリスク・ベネフィットのバランスを再確認すること、市販後安全性監視データを収集することなどである。2005 年に導入されたルールであり、新規承認品目のみに適用される。(すなわち効能追加の承認等は対象外である。)

条件付き承認制度の下での販売承認は、1 年ごとに更新しなければならない。一方、ひとたび条件に従ったデータが揃えば、条件付き承認は解除され、通常の承認に移行する (EC 規則 No.726/2004 第 14 条 7<sup>1)</sup>、EC 規則 No.507/2006<sup>3)</sup>、ガイドライン<sup>4)</sup>)。

2011 年 12 月時点で、本制度下で承認され販売されている品目は、以下の 9 品目である。

- Arzerra (ofatumumab : フルダラビン及びアプレムツマブに無効の慢性リンパ球性白血病)
- Cayston (aztreonam : 嚢胞性線維症患者における緑膿菌による慢性肺感染の抑制療法)
- Diacomit (stiripentol : てんかん強直間代発作)
- Fampyra (fampridine : 多発性硬化症)
- Intelence (etravirine : HIV-1 感染症)
- Tyverb (lapatinib : HER2 陽性の進行又は転移性乳がん)
- Vectibix (panitumumab : EGFR 陽性の転移性大腸がん)
- Votrient (pazopanib : 進行性腎細胞がん)

- Votubia (everolimus : 星細胞腫)

### C.7.3 米国における市販後試験の実施及びそのフォローアップ

#### (1) 関連する制度の概要と変遷

1997年のFDA近代化法（FDA Modernization Act）において、医薬品の市販後試験の進行を監視する権限がFDAに付与された（FDC Act（食品、医薬品、化粧品法）506B項）。ここでいう「市販後試験」とは、市販後に行われる各種の臨床試験及び非臨床試験のうち、FDAが実施を指示したもの又は企業がその実施についてFDAと合意したものを指す。（すなわち、市販後に企業が自主的に実施する試験は含まれない。）

この制度の下では、企業は、年次報告において、試験の実施状況をFDAに報告することが義務付けられる。米国における当該品目の承認日が基準となり、企業は、毎年の基準日から60日以内にFDAに報告書を提出する。報告書には、以下に示す情報を含めることとされている（21 CFR（連邦規則集）314.81、ガイダンス<sup>5)</sup>）。

- －申請者名
- －製品名、NDA番号
- －米国での承認日
- －市販後試験の約束日
- －市販後試験の約束の内容（目的、試験タイプ、被験者集団、適応・用量など）
- －市販後試験のスケジュール
- －市販後試験の現在の状況  
（保留中／実施中／遅延／中止／提出済）
- －試験状況の説明  
（被験者の集積率など）

一方FDAは、企業から報告された情報を整理の上、年1回Federal Register（連邦公報）で公表しなければならない。

従前は、市販後に臨床試験等が実施されるの

は、FDAと承認保持者（企業）との自主的な合意に基づく場合か、あるいは以下に示すような特殊な状況にある場合に限られていた。（これに基づく試験はPMC（Post-Marketing Commitment）と呼ばれる。）

- 迅速承認（Accelerated Approval）の対象とされた品目で、市販後に臨床的利点の証明が必要とされたもの（21 CFR 314.510）
- 小児研究平準化法（Pediatric Research Equity Act）に基づいて小児臨床試験が必要とされた品目（21 CFR 314.55(b)）
- 動物試験による有効性データをもって承認された品目で、市販後に臨床での有効性、安全性の証明が必要とされたもの（21 CFR 314.610(b)(1)）

その後、2007年のFDA改正法（FDA Amendments Act）による市販後安全対策強化の一環として、新薬（医療用に限る）の承認時又は承認後に製薬企業に対して市販後臨床試験等の実施を求める新たな権限がFDAに付与された（FDC Act 505(c)）。（これに基づく試験はPMR（Post-Marketing Requirement）と呼ばれる。）そして、このPMRについても、PMCと同様の形で、その状況に関するFDAへの報告が求められる。

#### (2) 市販後試験の実施及びそのフォローアップ状況

2010年9月末時点において未完了のPMRs及びPMCsの状況がFDAにより公表されている<sup>6)</sup>。PMRについては、NDA及びBLA合わせて675件のうち約90%が予定通り進行し、PMCについては、780件のうち約80%が予定通り進行している。（次表参照）

		NDA (化成品)	BLA (生物製剤)
--	--	--------------	---------------

PMRs	予定通り 進行	477/526 (91%)	131/149 (88%)
	予定変更	49/526 (9%)	18/149 (12%)
PMCs	予定通り 進行	399/473 (84%)	236/307 (77%)
	予定変更	74/473 (16%)	71/307 (23%)

(2010年9月30日データ)

予定通り進行している PMR 及び PMC は、さらに、保留中（試験は開始されていないが遅延の基準には該当しないもの）、実施中（スケジュール通りに試験が進行中であるもの）、提出済（試験は終了又は中止し試験報告書が FDA に提出されたもの）に分類される。予定変更の PMR 及び PMC は、遅延（元々のスケジュールから遅れているもの）、中止（試験が完了前に中止されたが試験報告書が FDA に提出されていないもの）に分類される。（右表参照）

2009年10月から2010年9月までに完了した PMR 及び PMC は合わせて 319 件あり、うち約 80%において当初の要求が満たされたと判断されている。

米国における PMRs 及び PMCs に関する情報はデータベース化され、FDA の web-site において、企業名、製品名、NDA/BLA 番号、試験の状況、試験実施の根拠規定などをキーワードとして検索が可能である。

予定 通り 進行	保留中	370/477 (70%)	91/131 (61%)
	実施中	66/477 (13%)	31/131 (21%)
	提出済	41/477 (8%)	9/131 (6%)
小計		477 (91%)	131 (88%)
予定 変更	遅延	47/49 (9%)	17/18 (11%)
	中止	2/49 (0.4%)	1/18 (0.7%)
	小計	49 (9%)	18 (12%)
合計		526	149

PMCs の状況		NDA (化成品)	BLA (生物製剤)
予定 通り 進行	保留中	201/399 (42%)	66/236 (21%)
	実施中	87/399 (18%)	95/236 (31%)
	提出済	111/399 (23%)	75/236 (24%)
	小計	399 (84%)	236 (77%)
予定 変更	遅延	67/74 (14%)	69/71 (22%)
	中止	7/74 (1%)	2/71 (0.7%)
	小計	74 (16%)	71 (23%)
合計		473	307

(いずれも 2010年9月30日データ)

### (3) 市販後試験が計画通りに進行していない場合の対応

上述のように、市販後試験 (PMR 及び PMC) の進捗状況については、該当企業から FDA 宛てに定期的に報告が行われる。試験が計画通りに進行していない場合は、それが直ちに違反と

PMRs の状況	NDA (化成品)	BLA (生物製剤)
----------	--------------	---------------

見なされるわけではなく、企業はそれに対する正当な理由を説明することになる。その説明が正当なものか否かの最終的な判断はFDAが行うことになるが、その基準は明文化されていない。

このような場合の罰則について、一般的な民事上の罰金の他、FDC Act 334 項には、FDAが人の健康への危険性等を認定した場合の製品差押え (seizure) について規定されている。しかし、米国製薬企業の法務担当者のお話では、このような罰則手続きの発動は非常に稀であるとのことである。

#### C.7.4 米国における既承認医薬品の承認取消し／取下げの手続き

##### (1) 関連する制度の概要と変遷

FDA は、申請者に対する通知 (Federal Register に掲載) とヒアリングの機会を与えた後に、以下のいずれか状況に該当すると判断した場合には、いかなる医薬品についてもその承認を取り消す (withdrawal approval) とされている。(FDC Act 505(e)、21 CFR 314.150)

- (1) 臨床経験その他科学的データから、承認に基づく使用において、当該医薬品が安全でないことが示されること
- (2) 臨床経験に基づく新たな証拠 (承認前には分からなかったもの) 等について、承認時に得られていた証拠と合わせて評価した結果、承認に基づく使用において、当該医薬品が安全でないことが示されること
- (3) 新たに得られた情報について、承認時に得られていた証拠と合わせて評価した結果、labeling に基づく使用において、当該医薬品が主張する効果を有するという実質的な証拠に欠けると判断されること
- ((4) 以下は省略)

なお、21 CFR 314.200 に、ヒアリングプロセスに関する詳細な規定が示されている。

さらに、迅速承認 (accelerated approval) 制度\* により承認された医薬品については、承認後に実施された臨床試験によって臨床上的有用性が示されなかった場合や、企業が要求された市販後試験を適切に実施しなかった場合には、その承認を迅速に取り消すという規定が設けられている。(21 CFR 314.530、601.43)

\* 重篤な疾患に対する医薬品であって、治療上の有用性が高いものについて、サロゲートエンドポイント (代替評価指標) に基づき承認する、あるいは安全確保のための使用制限の下で承認するという制度

##### (2) 承認取消し／取下げの事例

以下、近年の承認取消し／取下げの例として Avastin、Meridia、Meridia を取り上げて、その手続きと関連制度について概説する。

###### ● Avastin

Avastin (bevacizumab) は、2008 年 2 月に、迅速承認制度により転移性乳がんの効能追加の承認を受けた。追加で行われた 2 本の臨床試験において、PFS (無増悪生存期間) のわずかな延長が認められたものの種々の重篤な副作用が認められたことから、FDA はベネフィットに比べてリスクが大きいものと判断し、企業に対して当該効能の取下げを勧告した。当初、企業は同意せず、その後ヒアリング手続きなどが行われ、最終的には 2011 年 11 月に当該効能の承認が取り消された。

###### ● Mylotarg

Mylotarg (gemtuzumab ozogamicin) は、2000 年 5 月に、迅速承認制度により急性骨髄性白血病 (AML) の効能・効果にて承認された。その後 2004 年から開始された市販後臨床試験において、既存治療への本剤の上乗せ効果が示されず、本剤上乗せ群の方が死亡例が多いとの結果が得られたことから、当該試験は早期中止された。このため FDA は企業に対して承

認取下げを要請し、企業は自主的に承認を取り下げた。

#### ● Meridia

Meridia (sibutramine) は、1997年11月に、体重管理の適応で承認された。2002年3月にイタリアにおいて安全性の観点から本剤の販売の一時停止がなされ、米国においても心血管系リスクのためその承認取消しを求める請願が市民からFDAに提出された。FDAはlabelingの記載強化などを行ったが、その後実施された追加の臨床試験においても心血管系リスクが示されたことを受け、諮問委員会(Advisory Committee)で本剤の取扱いについて議論が行われた。最終的に2010年10月、FDAは企業に対して、本剤の自主的な市場撤退を要請し、企業はそれを受け入れた。

このように、米国では、医薬品の承認・上市後、追加で得られた情報に基づきFDAがその承認(又は効能・効果の一部)を取り消す、あるいは企業が自主的に承認を取り下げるといったケースが少なからず発生している。正確な統計はないが、FDAが承認を取り消すよりも、FDAからの承認取下げ勧告を受けて企業が自主的に承認を取り下げるといったケースの方が多いためである。これには、FDAの勧告にもかかわらず当該製品を販売し続けた場合、後に患者等から訴訟を起こされたときに不利になるという事情もあるらしい。

#### C.7.5 考察

欧州では、2010年は約50品目、2011年は47品目について販売承認の更新が行われており、2005年11月から開始された現行の承認更新制度に基づく作業が軌道に乗ってきた段階にあると言えよう。上記のうち、5年後に再度の更新が必要と判断された品目は、2010年は10品目であったのに対して2011年は20品目

と倍増し、さらに2011年には販売承認の更新が認められなかった品目も1件発生した。今後の動向が注目される。また、欧州では、個別品目に関する販売承認の更新を含めた市販後の種々の対応が、その簡単な背景等も含めてEPARに記載されweb-siteを介して公表されるというプロセスが確保されている。これは、医薬品の市販後情報を含めた透明性確保の観点から重要なものであり、参考となる。

米国においては、1997年のFDA近代化法に基づき市販後試験に対するFDAの監視権限の強化が図られて以後、関連規則やガイドラインが逐次整備され、市販後に実施される臨床試験等の状況が体系的にフォローアップされるシステムが構築されている。具体的には、企業からFDAへの年次報告の内容に関する詳細なガイダンスの公表、報告された情報のFDAにおけるデータベース化、Federal Register(連邦公報)及びFDAのweb-siteを介した情報公表プロセスの確立とその実施である。

近年、我が国においても、既承認医薬品について市販後に臨床試験等が実施されるケースが増えてきている。これらの試験は、承認に付された条件(いわゆる承認条件：薬事法第79条)を履行するために行われる試験、再評価指定を受けた医薬品について再評価申請資料の作成のために行われる試験(同第14条の6)など、その実施根拠が比較的明確なものと、承認審査の過程において規制当局から指示され、当局と申請企業との合意に基づいて実施される試験に大別できる。いずれについても、そのような市販後試験の進捗状況やその後の予定等は、新薬に関しては安全性定期報告書に記載され規制当局に提出されることになってはいるが、当該報告書は安全性に関する情報の報告に主眼が置かれ、有効性の再確認を主たる目的として実施されるような市販後試験の状況を的確にフォローアップするための手段としては十分ではない。また、新薬以外の既承認医薬

品について市販後臨床試験等が行われる場合、その進捗状況等を体系的に把握する手段は設けられていない。

今後、医療に関連する技術や情報の進歩に応じて、既承認医薬品の承認内容の見直しをより積極的、機動的に行っていくことは、医薬品の適正使用の推進及び安全対策の強化の一環としても重要な作業となる。このためには、その評価判断の材料となる市販後の各種試験の適切な実施と管理が不可欠であり、そうした観点からの我が国の関連規制の見直しが検討されるべきであろう。

また、欧州及び米国ともに、医療ニーズが高い医薬品について、不完全な承認申請データ（特に臨床試験のデータ）であっても承認し、市販後の安全監視・対応をより厳格に行うという法制度を有していることは興味深い。具体的には、欧州の条件付き販売承認制度、米国の迅速承認制度であり、いわば例外的な承認を制度化しているわけである。これを日本の特例承認制度、承認時の条件付帯（いわゆる承認条件）と比較すると、特例承認制度は「・疾病のまん延その他の健康被害の拡大を防止するため緊急に使用されることが必要な」（薬事法第 14 条の 3）医薬品を対象とするものであり、外国（米国又は欧州を想定）での承認前例を必要とするなど、対象が比較的限定されている。また、承認条件についても、必ずしも承認時のデータの不完全性を前提としたものではない。今後、特殊な状況下での承認が必要となる医薬品が増えていく可能性があり、また、国際調和の観点からも、市販後安全対策の強化と併せて、医療ニーズが殊更高い医薬品に対する特別な承認のあり方について、その制度化（明確化）も含めた検討を開始すべき時期に来ているものと考えらる。

## D. 結論

### D.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

- 1) 製造方法の開発・変更モデルとしてトラスツズマブの実験的製造システムを確立した。
- 2) 本研究で作製したトラスツズマブは、LC/MS を用いた質量測定の結果、市販のトラスツズマブと同一の質量であったことから、目的とする一次構造と糖鎖構造をもつ抗体が得られたものと結論付けた。
- 3) BIACORE を用いたトラスツズマブ定量法、CHO 細胞由来タンパク質の定量法、CHO 細胞由来 DNA の定量法が確立され、製造工程を評価することが可能となった。

したがって、本研究で構築したトラスツズマブの試験的製造工程と各種解析法は、QbD に関する研究を推進するための重要なツールとなるものと期待される。

### D.2 先端バイオ医薬品の生物学的試験法に関する研究

- 1) 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への適応可能性について検討を行い、その有用性を明らかにした。
- 2) 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 系の PBMC を用いた ADCC 活性測定系の代替試験法として有用性について明らかにした。

### D.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

製造方法の異なる 3 種類の IFN-β 1a 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その有用性について検討した。その結果、表示単位に依存した遺伝子発現の促進が観察されたが、その単位依存性については若干の違いがみられた。本法は間接的ではあるが細胞変性効果アッセイとの相関が示された。したがって、本法は細胞変性効果アッセイと置き換え

可能な簡便で高感度及び高精度な IFN-β1a 製剤の力価測定法として有用であることが示された。

#### D.4 遺伝子治療用医薬品の規制に関する国際調和推進のための基盤的研究

遺伝子治療薬の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、EMA のガイダンスを中心に検討した。遺伝子治療薬はプラスミド、ウイルスベクター、非ウイルスベクター、遺伝子導入細胞など様々な性質の異なる種類のものが含まれるが、これらに共通して必要とされる非臨床試験要件と、各遺伝子治療薬の種類により異なる個別の考慮事項について考察した。今後の国際調和ガイダンスや、我が国における関連指針の作成において非常に参考になると考えられる。

#### D.5 医薬品一般試験法の国際調和を促進するための研究

ICH 品質関連の議論に象徴されるように医薬品品質管理の方策が変化しつつある中、医薬品の規格基準書であり、医薬品品質一般試験法の国際調和の場ともなっている薬局方について、製造工程管理に関連する記載を整理し、比較した。USP は一般試験法や各条規格については特段の対応はとっていないものの、参考情報に製造工程での品質管理に関する解説を積極的に取り込んでいる。一方 EP は、一般試験法や各条規格に製造工程管理に配慮した設定の導入を図っている。日局においては、現状では USP と同様な対応となっているが、扱っている範囲は限定的であり、日局の普及、品質管理現場での活用をはかる上で、新たな対応が望まれるところである。

#### D.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 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 Q-IWG の活動に参加し、QbD の導入に関する 6 つの PtC をまとめた。

#### D.7 臨床試験における海外の規制状況の調査研究

欧米における販売承認の更新、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、既承認医薬品の承認取消し等に関する規制及びその運用状況を調査研究した。欧州における販売承認の更新制度は着実に運用されており、米国では市販後試験に対する FDA の監視権限の強化が図られて以後、関連規則やガイドラインが逐次整備・運用されてきている。今後、医療に関連する技術や情報の進歩に応じて、既承認医薬品の承認内容の見直しをより積極的、機動的に行っていくことは、医薬品の適正使用の推進及び安全対策の強化の一環としても重要な作業となる。欧米の状況も参考にしつつ、その評価判断の材料となる市販後の各種試験の適切な実施と管理、臨床試験結果を含めた医薬品市販後の情報の一層の透明化のための検討が不可欠となろう。

#### E. 健康危険情報

該当なし

#### F. 参考資料

- 1) Regulation (EC) No.726/2004 of the European parliament and the council of 31 March 2004. (EC 規則 No.726/2004)
- 2) Directive 2001/83/EC of the European parliament and the council of 6 November 2001. (EC 指令 2001/83)
- 3) Commission regulation (EC) No.507/2006 of 29 March 2006 on the conditional marketing authorization for medicinal products for human use falling within the scope of

- Regulation (EC) No.726/2004 of the European Parliament and of the Council. (EC 規則 No.507/2006)
- 4) Guideline on the scientific application and the practical arrangements necessary to implement commission regulation (EC) No.507/2006 on the conditional marketing authorization for medicinal products for human use falling within the scope of regulation (EC) No.726/2004. EMEA Dec 2006.
- 5) Guidance for Industry: Reports on the status of postmarketing study commitments – Implementation of Section 130 of the Food and Drug Administration Modernization Act of 1997. US FDA. Feb 2006.
- 6) Federal Register. Vol.76, No.150, Aug 4, 2011.
- 7) Search: Postmarket Requirements and Commitments for Human Drugs.  
<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/pmc/index.cfm>
1. 研究発表
1. 論文発表
- 1) T. Urayama, S. Sapsutthipas, M. Tsujikawa, A. Yamashita, H. Nishigaki, M.S. Ibrahim, K. Hagiwara, M. Yunoki, T. Yasunaga, T. Yamaguchi, K. Ikuta: Full-Length Sequences of One Genotype 4 and Three Genotype 3 Hepatitis E Viruses in Fecal Samples from Domestic Swine in Japan, *The Open Veterinary Science Journal*, 4, 11-19 (2010)
- 2) 内田恵理子、山口照英: 医薬品のウイルス安全性確保: 核酸増幅検査 (NAT) による C 型肝炎ウイルス検出の評価と NAT による高感度検出のためのウイルス濃縮法の開発、*YAKUGAKU ZASSHI*, 130 (2), 163-169 (2010)
- 3) T. Yamaguchi, T. Arato: Quality, safety and efficacy of follow-on biologics in Japan, *Biologicals*, 39, 328-332 (2011)
- 4) T. Arato, T. Yamaguchi: Experience of reviewing the follow-on biologics including Somatropin and erythropoietin in Japan, *Biologicals*, 39, 289-292 (2011)
- 5) 山口照英: バイオ医薬品の薬事法改正におけるウイルス安全性確保および関連する国内外の情報. 「医薬品の品質管理とウイルス安全性」, 山口一成編, 文光堂, 42-52 (2011)
- 6) 山口照英: バイオ後続品/バイオシミラーの規制動向と今後の展望. 「バイオシミラー・バイオベターの開発・事業化支援マニュアル」, 技術情報協会刊, 3-15 (2011)
- 7) 山口照英: 第 II 編 バイオ医薬品の製剤設計と品質管理・第 1 章 バイオ医薬品開発初期での品質・安全性確保. 次世代バイオ医薬品の製剤設計と開発戦略, 森下真莉子監, シーエムシー出版, 67-77 (2011)
- 8) A. Harazono, T. Kobayashi, N. Kawasaki, S. Itoh, M. Tada, N. Hashii, A. Ishii, T. Arato, S. Yanagihara, Y. Yagi, A. Koga, Y. Tsuda, M. Kimura, M. Sakita, S. Kitamura, H. Yamaguchi, H. Mimura, Y. Murata, Y. Hamazume, T. Sato, T. Natsuka, K. Kakehi, M. Kinoshita, S. Watanabe, T. Yamaguchi: A comparative study of monosaccharide composition analysis as a carbohydrate test for biopharmaceuticals, *Biologicals*, 39, 3, 171-180 (2011)
- 9) 遊佐敬介, 山口照英, 川崎ナナ: ヒトに感染が疑われているレトロウイルスとウイルス安全性. 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 42, 5, 444-447 (2011)

- 10) 山口照英, 内田恵理子: 第 16 改正日本薬局方の改正点 一般試験法 (参考情報を含む) の改正-② 生物薬品関連試験, 薬局, 62, 6, 2633-2638 (2011)
- 11) 山口照英: 第 16 改正日本薬局方の改正点 一般試験法 (参考情報を含む) の改正-④ 生物薬品, 薬局, 62, 6, 113-118 (2011)
- 12) 橋井則貴, 川崎ナナ, 秦 艶, 山口照英: 日局医薬品各条へパリンナトリウム確認試験及び純度試験, 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 42, 827-83 (2011)
- 13) 中澤志織, 橋井 則貴, 鈴木琢雄, 多田 稔, 石井明子, 川崎ナナ: バイオ医薬品の品質・安全性に関する最近の話題 特性解析の新しい位置づけと重要性 レギュラトリーサイエンス学会誌 2(1), 21-30 (2012)
- 14) 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 4 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス Vol. 42, No.9 818-826 (2011)
- 15) 橋井則貴, 石井明子, 新見伸吾, 川崎ナナ 共著: 「第 1 章申請に必要な品質評価試験項目設定でのポイント 第 1 節申請をふまえた構造・特性解析での押さえ所」「第 1 章 第 2 節申請で求められる不純物分析のポイント」, 『バイオ医薬品 CMC 申請のための品質評価と申請書作成 実学集』, 技術情報協会(東京), 3-18, 19-35 (2011)
- 16) 新見伸吾, 石井明子, 川崎ナナ: バイオ医薬品の不純物の評価(1) ファームテクジャパン Vol. 28, No.3 43-38 (2012)
- 17) 新見伸吾, 石井明子, 川崎ナナ: バイオ医薬品の不純物の評価(2) ファームテクジャパン Vol. 28, No.4 113-119 (2012)
- 18) 新見伸吾: 第 6 章 ウイルス除去, 不活化 2) 抗体医薬品製造におけるプラットフォーム精製工程によるウイルスクリアランス, 不純物の除去, 『医薬品の品質管理とウイルス安全性』, 文光堂, 222-236 (2011)
- 19) 新見伸吾: ヒト IgG 及びヒト化モノクローナル抗体製剤において様々なストレスにより誘導された凝集体の粒子径及び相対光散乱強度の動的散乱による測定, *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, 129, 55-60 (2011)
- 20) Teruhide Yamaguchi and Eriko Uchida: Oncolytic Virus: Regulatory Aspects from Quality Control to Clinical Studies, *Current Cancer Drug Targets* (印刷中)
- 21) 内田 恵理子: 遺伝子治療の動向と課題, *ヒューマンサイエンス*, 22(4), 28-32 (2011)
- 22) 内田恵理子: “バイオ医薬品・生物薬品のウイルス安全性に関する国際動向”、医薬品の品質管理とウイルス安全性(第 2 章医薬品に関するウイルス安全性確保と薬事法 3) 日本医薬品等ウイルス安全性研究会編、(株)文光堂、東京 (2011)、pp53-63
- 23) Sakai-Kato K, Ota S, Hyodo K, Ishihara H, Kikuchi H, Kawanishi T. Size separation and size determination of liposomes. *J.Sep.Sci.* 20, 2861-2865, (2011).
- 24) 2) Izutsu, K., Yomota, C., Kawanishi, T.: Stabilization of liposomes in frozen solutions through control of osmotic flow and internal solution freezing by trehalose, *J Pharm Sci.*, 100, 2935-44 (2011)
- 25) 3) Miyazaki, T., Aso, Y., Kawanishi, T.: Feasibility of Atomic Force Microscopy for Determining Crystal Growth Rates of Nifedipine at the Surface of Amorphous Solids with and Without Polymers. *J.Pharm.Sci.*, 100, 4413-4420 (2011).

- 26) 4) Izutsu, K., Yomota, C., Kawanishi, T.:  
Impact of heat treatment on the  
physical properties of noncrystalline  
multisolute systems concentrated in  
frozen aqueous solutions, *J.*  
*Pharmaceut.Sci.*, **100**, 5244-53, (2011)
- 27) 5) Sakai-Kato, K., Ota, S., Takeuchi, T.,  
Kawanishi, T.: Size separation of  
colloidally dispersed nanoparticles  
using a monolithic capillary column., *J*  
*Chromatogr A.*, **1218**, 5520-6, (2011)
- 28) 6) Miyazaki, T., Aso, Y., Yoshioka, S.,  
Kawanishi, T.: Differences in  
crystallization rate of nitrendipine  
enantiomers in amorphous solid  
dispersions with HPMC and HPMCP,  
*Int J Pharm*, **407**, 111-8 (2011)
- 29) 7) 川西徹 製剤総則の改正概要とその影  
響 *ファームテックジャパン* **27**, 15-22  
(2011)
- 30) 川西徹 第16改正日本薬局方の主な改正  
点 *日本薬剤師会雑誌* **62**, 87-91 (2011)
- 31) Sakai-Kato, K., Ishikura, K., Oshima, Y.,  
Tada, M., Suzuki, T., Ishii-Watabe, A.,  
Yamaguchi, T., Nishiyama, N., Kataoka,  
K., Kawanishi, T., Okuda H.:  
Evaluation of intracellular trafficking  
and clearance from HeLa cells of  
doxorubicin-bound block copolymers,  
*Int J Pharm*, **423**, 401- 409 (2012)
- 32) 川西徹 日本薬局方の今とこれから *フ  
ァルマシア* **48**, 119-123 (2012)
- 33) 川西徹 医薬品の品質を巡る話題 -化  
学合成医薬品に関わるレギュラトリーサ  
イエンス- *レギュラトリーサイエンス  
誌* **2**, 67-73 (2012)
- 34) 檜山行雄、ICHQ8,Q9,Q10 ガイドライン  
の実践・導入活動のその後、*医薬品医療機器  
レギュラトリーサイエンス*, **42**, 796-801(2011)

## 2. 学会発表

- 1) 多田稔、石井明子、鈴木琢雄、川崎ナナ：  
Fc $\gamma$  受容体発現細胞を用いた抗体医薬品  
の ADCC 活性評価系の開発 *日本薬学  
会第 132 年会* 2012 年 3 月 札幌
- 2) 原島 瑞、日向昌司、長岡陽子、齊藤千恵  
子、布留川みなこ、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  
けるデキサメタゾン依存的な特異的遺伝  
子の mRNA レベルの増加のプロテアソーム  
阻害剤による制御機構の解明 第 84 回  
日本生化学会大会、京都 (2011 年 12 月  
7-10 日)
- 3) 新見伸吾：生物薬品の免疫原性と安全性に  
ついて 平成 23 年 11 月 11 日全国衛生化  
学技術協議会年会 自由集会部門 (2011.  
11) (長野)
- 4) 新見伸吾：バイオ医薬品における免疫原性  
のリスク因子について 平成 24 年 2 月 10  
日 日本製薬工業協会 バイオ医薬品委  
員会 技術実務委員会 全体会合、(2012.  
2) (東京)
- 5) 新見伸吾：免疫原性のリスク因子と予測方  
法 -有効性に及ぼす影響、低下させる治  
療戦略- 平成 24 年 3 月 12 日 薬事エキ  
スパート研修会 第 4 回 品質/科学技術  
特別研修 (2012.3) (大阪)
- 6) Shingo Niimi : Risk factors of  
immunogenicity and their mitigation,  
*Immunogenicity Seminar 2012* (2012.3)  
(東京)
- 7) Shingo Niimi : Japanese Concerns of the  
Japanese Regulatory Agency regarding  
Immunogenicity of Monoclonal  
Antibody Products in Relation to their  
efficacy and Safety, 1st Immunogenicity  
Determinates and Correlates  
Conference Prediction and Mitigation

Risk (2011.5) (United States)

- 8) 古田美玲、内田恵理子、中西真人、西村健、大高真奈美、山口照英：gp91phox 搭載持続発現型センダイウイルスベクターによる X-CGD モデルマウス細胞の機能回復、第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 13～16(横浜)
- 9) 檜山行雄、Q8,Q9,Q10 の接続、ICH 研修会 日本製薬工業協会、日本公定書協会共催、平成 23 年 4 月 25 日(東京)
- 10) Yukio Hiyama, Process Validation and Continuous Process Verification, APEC DIA シンポジウム April 2011(ソウル)
- 11) 檜山行雄、“イントロダクション Quality by Design について” 平成 23 年 11 月 16 日第 108 回薬事エキスパート研修会『Quality by Design の実際とその審査・調査について』、医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス財団 (東京)

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

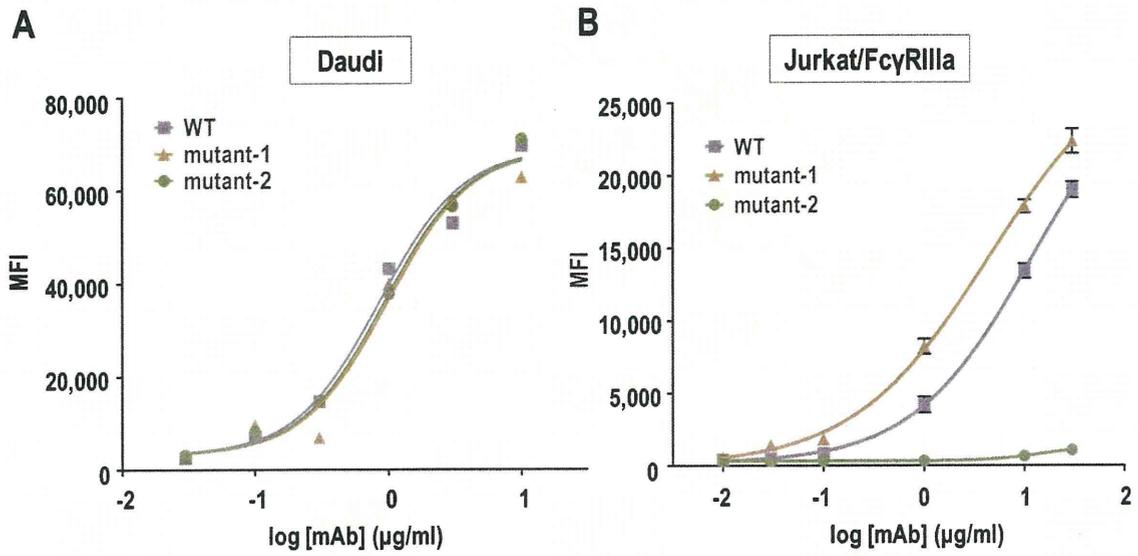


図 2-1 フローサイトメーターを用いた Cell-based binding assay  
 A : Daudi 細胞に対するリツキシマブ野生型および改変体の結合  
 B : Jurkat/FcγRIIIa 細胞に対するリツキシマブ野生型および改変体の結合

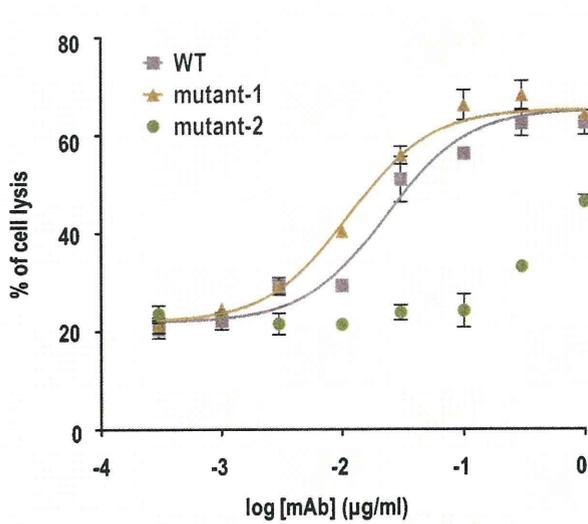


図 2-2 末梢血単核球細胞を用いた ADCC 活性測定

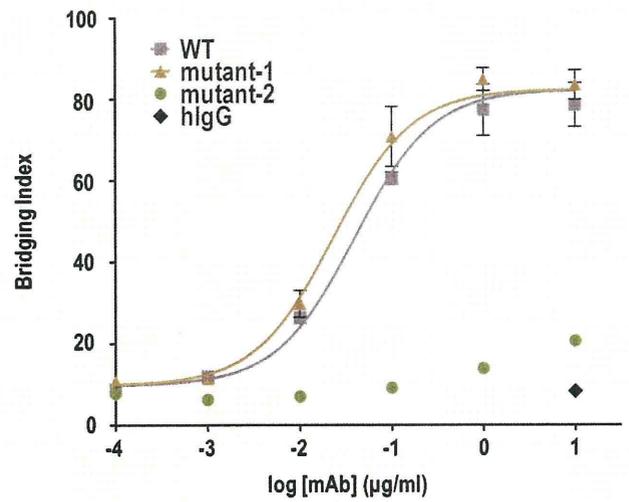


図 2-3 Jurkat/FcγRIIIa 細胞を用いた Bridging Assay

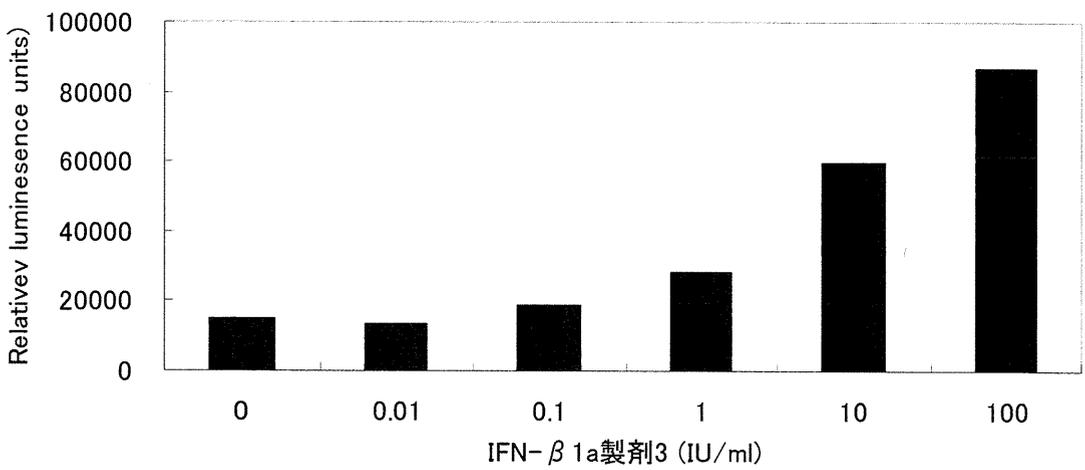
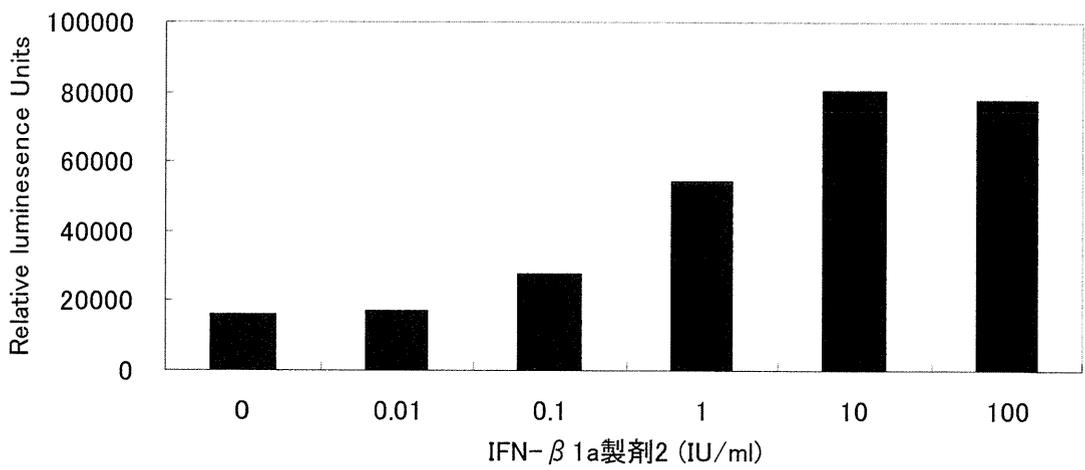
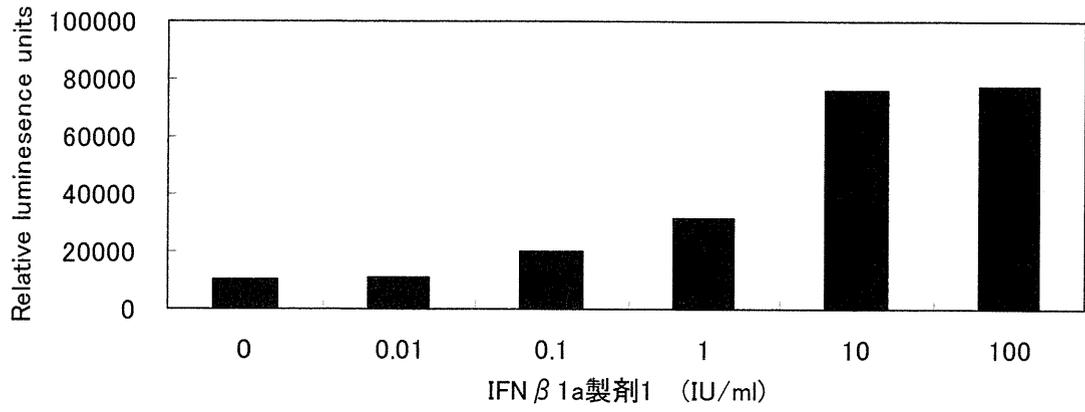


図3 IFN-β1a 製剤の力価測定

分担研究報告書

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

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

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	部長
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	室長
研究協力者	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
研究協力者	栗林 亮佑	国立医薬品食品衛生研究所	生物薬品部	研究員

**研究要旨** バイオ医薬品のデザインスペースの設計等 QbD に関する研究の推進を目的とし，トラスツズマブをモデルとした実験的製造システムを構築した。公知のアミノ酸配列を基に構築したトラスツズマブ発現ベクターを用いてトラスツズマブ安定発現 CHO 細胞株を樹立した。無血清培養による培養工程，プロテイン A カラムクロマトグラフィー及び陽イオン交換クロマトグラフィーの 2 段階の精製工程を設定し，実験的な製造を試みた。インタクトの状態でもマススペクトルを解析した結果，本研究で製造したトラスツズマブは，市販のトラスツズマブと糖鎖部分を含め同一質量であることが確認できた。また，BIACORE を用いた SPR イムノアッセイ，ELISA，及び定量 PCR を用いたトラスツズマブ，宿主由来タンパク質，及び宿主由来 DNA の定量法をそれぞれ確立した。本研究で構築したトラスツズマブの実験的製造システムは，QbD に関する研究を推進するための重要なツールとなるものと期待される。

## A. 研究目的

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の運用であれば，パラメーター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。

## B. 研究方法

### B.1 トラスツズマブ発現体の作製

#### B.1.1 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み込むために、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)。

### B.1.2 トラスツマブ安定発現株の樹立

トラスツマブの 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%ウシ胎仔血清を添加した 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.2 製造工程の開発

### B.2.1 培養工程

#### 予備培養工程

CHO-TZM 細胞を、10% F12 培地 (SIGMA) で 10 cm 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% CO<sub>2</sub> 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、10 cm ディッシュあたり 6 mL 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。

### B.2.2 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 を含むようなリニアグラジェントで溶出した。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.3 特性解析

#### B.3.1 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。ランニング液は、10 mM HEPES buffer pH 7.4, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% Surfactant P20 (HBS-EP buffer, GE Healthcare) を用い、25°C で行った。

##### (1) センサーチップの作製

CM5 センサーチップ (GE Healthcare) に 25 mM NHS / 100 mM EDC 溶液を 7 分間、流速 10  $\mu$ L/min でインジェクトして活性化させた。活性化 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 HER2 Fc 融合タンパク質を 70  $\mu$ L インジェクトして固定化させた後、1 M エタノールアミン pH 8.5, 70  $\mu$ L でブロッキングした。

##### (2) 測定条件

HBS-EP buffer で平衡化した後、流速 100  $\mu$ L/min で試料 100  $\mu$ L をインジェクトした。結合量は、試料の注入開始 10 秒前のレゾナンスユニット (RU) から試料の注入終了 1 分後の RU を引いた値とした。各測定が完了した後、センサーチップを 25  $\mu$ L の 0.1 M Glycine-HCl buffer pH 2.4, 0.5 M NaCl をインジェクトして再生した。

##### (3) 検量線の作成

Herceptin (Roche) 溶液の希釈系列 (18.75 ~ 600  $\mu$ g/mL) について結合量を測定し、Excel

2003 (Microsoft) で近似式を求め、検量線を作成した。

#### B.3.2 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) を用いた ELISA 法をメーカーのプロトコルに従って行った。キットに添付されている CHO 細胞由来タンパク質標準溶液を用い、得られた数値から Excel 2003 (Microsoft) で近似式を求め、検量線を作成した。

#### B.3.3 CHO 細胞由来 DNA の定量

##### (1) 測定条件

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、テンプレートの希釈は、EASY Dilution (Takara) 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。

##### (2) 検量線の作成

CHO 細胞のゲノム DNA の希釈系列を標準物質とし、DNA 濃度を導出パラメーター、定量 PCR で得られた Ct 値を初期パラメーターとして Excel 2003 (Microsoft) で近似式を求め、検量線とした。

#### B.3.4 SDS-PAGE

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

#### B.3.5 インタクト解析

##### サンプル調製

市販品のトラスツズマブであるハーセプチ



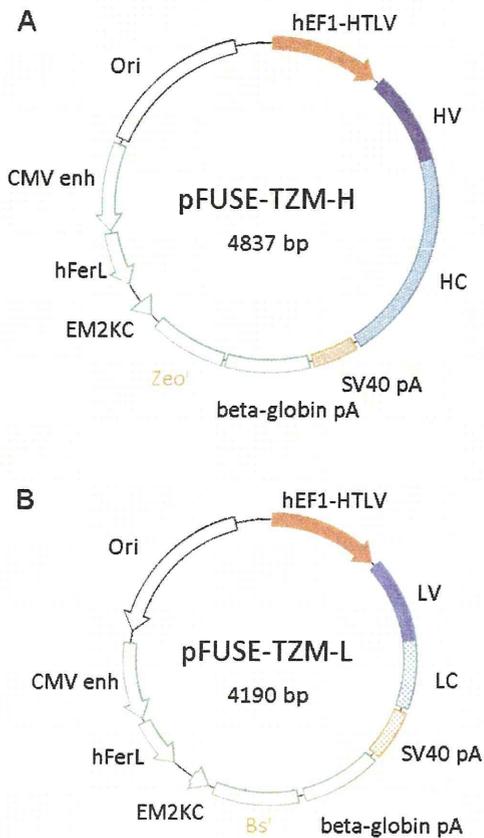


図2 トラスツズマブ H鎖発現ベクター及びL鎖発現ベクター

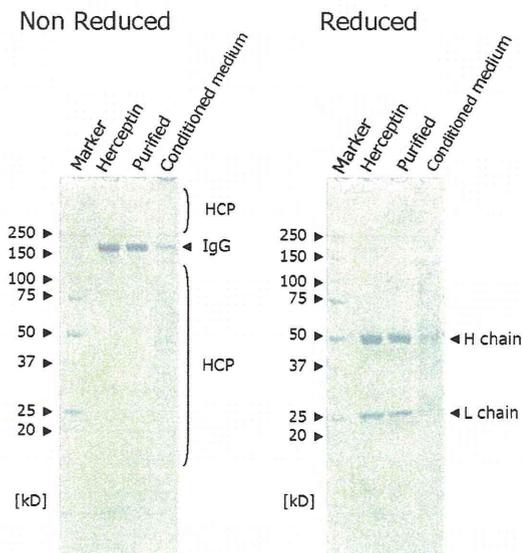


図3 一過性発現で産生させたトラスツズマブの SDS-PAGE

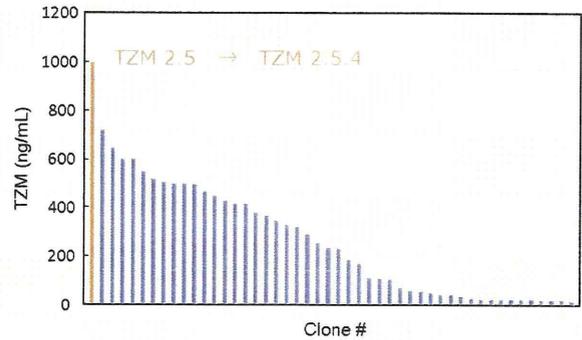


図4 トラスツズマブ発現クローンにおけるトラスツズマブ発現量

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 2A) 及び L 鎖発現ベクター (図 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 3)。

### C.1.2 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 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。