

201102002B

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 21 ～ 23 年度 総合研究報告書

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21～23年度 総合研究報告書

研究代表者 山口 照 英

平成24 (2012) 年 5月

目 次

I. 総合研究報告

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. 分担総合研究報告

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----- 15

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-----43

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----- 67

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----- 81

内 田 恵 理 子

5. 医薬品一般試験法の国際調和を促進するための研究-----105

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-----125

檜 山 行 雄

7. 臨床試験における海外の規制状況の調査研究-----141

成 川 衛

III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----151

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平成21年度から23年度までの3年間研究を実施し、以下の成果を得た。

- 1) バイオ医薬品の品質管理におけるQuality by Design(QbD)の推進を目的としたケーススタディを実施するため、組換えヒト卵胞刺激ホルモン及び抗体医薬品のトラスツズマブ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。構築した実験的製造システムと各種解析法は、QbDに関する研究を推進するための有用なツールとなるものと期待される。
- 2) 先端バイオ医薬品である抗体医薬品の開発動向を明らかにするとともに、抗体医薬品の生物活性評価の課題とされる抗体と抗原及びFc γ 受容体の結合が関与する抗体依存性細胞傷害活性(ADCC)の新たな評価法として、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、その有用性を明らかにした。
- 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として、製造方法の異なる複数の組換えヒト肝細胞増殖因子(rhHGF)、抗ヒト血管内皮増殖因子(VEGF)抗体製剤、天然型及び組換えインターフェロン β 1a(IFN- β 1a)製剤の生物活性試験について検討しバイオ医薬品の同等性/同質性評価における生物活性の重要性を明らかにした。
- 4) 遺伝子治療薬規制の国際調和推進のための研究として、遺伝子治療用ベクターや腫瘍溶解性ウイルス製品を投与した患者の排泄物からのウイルスやベクターの排出と伝播のリスク評価法に関する国際調和指針に盛り込むべき要件及び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を考察した。
- 5) 薬局方一般試験法の国際調和に関する研究として、製剤総則の大改正に伴い整備が必要な製剤試験法のリストアップと欧米薬局方での収載状況、国際調和製剤試験法の日米欧各薬局方への取込の現状、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関する各薬局方の記載の現状を明らかにするとともに、日局の今後のあり方について考察した。
- 6) ICH 医薬品規制調和国際会議の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導入・実践に関する実施作業部会(Q-IWG)の活動及び関連の議論について報告した。Q-IWGによるQ&A、教育資料、Points to Considerの作成により、技術面のみならず行政面においても相乗的な国際調和の進展が期待される。
- 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、将来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			生物薬品部 第三室長
川崎 ナナ	国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部長	内田 恵理子	国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部 第一室長
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	川西 徹	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	檜山 行雄	国立医薬品食品衛生研究所

	薬品部 客員研究員
成川 衛	北里大学薬学部 医薬開発学准教授
研究協力者	
橋井 則貴	国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 第一室長
日向 昌司	国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 主任研究官
栗林 亮佑	国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 研究員
多田 稔	国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 研究員
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

抗体医薬品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ことを目的として研究を実施した。

B. 研究方法

本研究では、具体的には以下の分担研究課題について、各分担研究者が調査研究、実証研究、海外動向調査を通じた検討を実施した。

- 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 (川崎)
- 2) 先端バイオ医薬品の生物学的試験法に関する研究 (石井)
- 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 (新見)
- 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 (内田)
- 5) 医薬品一般試験法の国際調和を促進するための研究 (川西)
- 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 (檜山)
- 7) 臨床試験における海外の規制状況の調査研究 (成川)

なお、各研究の詳細については、各研究分担者の総合分担研究報告書を参照されたい。

(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

バイオ医薬品原薬製造・品質管理にも、Quality by Design (QbD) が取り入れられるようになり、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の設定にも関心が高まっている。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。

そこで、本分担研究では、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。平成 21 年度及び 22 年度は、モデルとして、糖鎖構造や活性の研究が進んでいる卵胞刺激ホルモン (FSH) に着目し、実験的製造システムを構築し、糖鎖構造と活性の変動の解析した。また、平成 23 年度は、モデルとして、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に着目し、実験的製造システムを構築した。

組換えヒト FSH については、FSH 高発現株及び精製用抗体を開発し、LC/MS を用いて目的としたアミノ酸及び糖組成からなる糖タンパク質が得られたことを確認した。また、生物活性を評価するため、レポータージーンアッセイ/表面プラズモン共鳴 (SPR) イムノアッセイを利用した比活性測定法を開発した。この方法は生物活性評価法として有用であること、また、同等性/同質性評価法や Process Analytica Technology (PAT) としても利用できる可能性が示唆された。

トラスツズマブについては、トラスツズマブ安定発現 CHO 細胞株を樹立し、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 段階の精製工程からなる実験的な製造を試みた。インタクトの状態でマスマ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、SPR イムノアッセイ、ELISA、及び定量 PCR を用い、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、製造工程を評価することが可能となった。

したがって、本研究で構築した組換えヒト FSH 及びトラスツズマブの実験的製造システムと各種解析法は、QbD に関する研究を推進するための有用なツールとなるものと期待される。

C.2 先端バイオ医薬品の生物学的試験法に関する研究

代表的な先端バイオ医薬品である抗体医薬品の生物活性は、抗原との結合およびそれに伴う中和・阻害活性に加え、ナチュラルキラー細胞 (NK 細胞) 等のエフェクター細胞上の Fc 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。これらは抗体医薬品の抗腫瘍効果に関わる主要なメカニズムの一つである一方で、サイトカイン等の活性中和を目的とする抗体医薬品では安全性上の問題となり得る作用である。抗体の分子構造上、ADCC 活性や CDC 活性は Fc 領域が担っているが、Fc 領域に存在する N 結合型糖鎖の構造により、その活性が変動することが知られている。そのため、これらのエフェクター活性は、製造工程の変動による影響を受ける可能性が高く、製造工程の一定性を確保し、製品の有効性・安全性を担保する上でも重要な評価指標になると考えられる。

そこで本分担研究では、医薬品開発及び医薬

品品質確保の国際調和に関する動向を踏まえ、抗体医薬品について有効性・安全性に直結する生物活性の評価法に関する技術的課題を明らかにし、その課題を解決し得る新しい生物活性評価法を開発することを目的とした。

平成 21 年度は、近年の抗体医薬品開発動向を調査し、エフェクター活性を増強あるいは減弱した抗体医薬品の開発が進んでいること、また、これらの抗体医薬品の生物活性評価の課題として、抗体と抗原及び Fc γ 受容体の結合が関与する ADCC 活性の評価法の開発が必要とされていることを明らかにした。

平成 22~23 年度は、ADCC 活性を持つ抗体医薬品の評価に有用な方法として、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、その有用性を検証した。Fc γ 受容体発現細胞株を用いた Cell-based Binding Assay は、抗 TNF α 抗体及び抗 CD20 抗体を用いたモデル実験により、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、抗原発現細胞及び Fc γ 受容体発現細胞株を用いた Bridging Assay は、抗 CD20 抗体を用いたモデル実験により、標的細胞のうちエフェクター細胞と架橋された細胞の割合を bridging index とすることで、抗体医薬品の抗原結合能と Fc γ 受容体結合能を評価できること、Bridging assay は、頑健性の高い試験法確立が困難とされる末梢血単核球を用いる従来の ADCC 活性の代替試験法になり得ることを示した。

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

タンパク質性バイオ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の同等/同質性を評価することが必要である。さらに、品質特性に違いがある場合においても、有効性及び安全性において先発品と同等/同質性が認められれば承認が可能な場合もありうる。したがって、バイオ後続品の同等/同質性評価は、構造に関する品質特性だけでなく、生物活性の観点からも評価を行うことが重要と考えられる。そこで、本分担研究では、製造方法の異なる組換えヒト肝細胞増殖因子(rhHGF)、抗ヒト血管内皮増殖因子(VEGF)抗体製剤、天然型及び組換えインターフェロン β 1a (IFN- β 1a)製剤の生物活性試験について検討した。

平成 21 年度は、CHO 細胞、High-5 昆虫細胞、マウスミエローマ細胞で製造された rhHGF の生物活性、抗原価及び受容体に対する結合能について、それぞれ初代培養ラット肝細胞の DNA 合成促進、ELISA 及び SPR 法により測定した。その結果、各 rhHGF は各測定法で異なる値を示し、各製品間における相対強度は全ての測定法で同じ傾向を示した。したがって、rhHGF は製造方法により活性が異なり、活性の観点からも同等/同質性を評価することの重要性が示された。

平成 22 年度は、大腸菌及び CHO 細胞で生産した組換え抗ヒト VEGF 抗体製剤の生物活性について、VEGF による HUVEC の増殖促進の阻害アッセイ及び SPR 法により測定した。その結果、VEGF による HUVEC の増殖促進の阻害アッセイは製造方法の異なる抗 VEGF 抗体製剤の活性比較に有用であること、SPR 法は VEGF による HUVEC の増殖促進の阻害アッセイに代替できず、採用にあたっては、測定条件の検討など慎重に見極めることが肝要であることが明らかになった。

平成 23 年度は、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た。本法は IFN- β 1a 製剤の力価の違いを識別可能な力価測定法として有用であることが示された。

C.4 遺伝子治療用医薬品の規制に関する国際調和推進のための基盤的研究

本分担研究では、遺伝子治療用医薬品の品質、安全性確保のための規制に関する国際調和推進のための基盤的研究の一環として、平成 21 年度及び 22 年度は遺伝子治療用ベクターや腫瘍溶解性ウイルス製品を投与した患者の排泄物からのウイルスやベクターの排出と伝播のリスク評価法について、23 年度は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検討した。

ウイルスやベクターの排出と伝播のリスク評価については、今後、国際調和指針の作成に当たり、指針に盛り込むべき要件法について、ICH 見解「ウイルス/ベクターの排出に関する基本的考え方」を基に検討した。21 年度は、ウイルスやベクターの生物学的特徴と排出の評価法の観点で検討した。排出と伝播のリスク評価に影響するウイルスやベクターの生物学的特徴としては増殖能や持続性・潜伏感染、感染指向性と投与・感染経路が重要であり、免疫系の影響や導入遺伝子も影響することを示した。また、排出の試験法として主に用いられる核酸増幅検査と感染性試験を中心に、各試験法の特徴と問題点、試験法確立における注意点及び試験結果の解釈のあり方を明らかにした。22 年度は非臨床試験及び臨床試験での排出試験と伝播のリスク評価のあり方の観点から検討した。非臨床の排出試験は臨床の排出試験の立案、特にサンプルの種類やサンプリング頻度、試験期間の設定に有用であるが、動物モデルには限界があり臨床での排出試験の代替とはならないと考えられる。臨床での排出試験は、親

ウイルス/ベクターの生物学的特性、増殖能、投与量、投与経路、患者集団とその免疫状態等を考慮して、可能な限り初期の試験で実施する必要がある。さらに、臨床では伝播の可能性と結果についてリスク評価を実施すべきであり、評価に際して考慮すべき事項を考察した。

一方、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は、EMA のガイダンスを中心に検討した。遺伝子治療薬に共通して必要とされる非臨床試験としては、非臨床モデルを用いた薬力学的試験、生体内分布試験、投与量設定のための試験、毒性試験、遺伝子組込み試験、生殖細胞への遺伝子導入、標的組織特異性、免疫原性、免疫毒性試験、排出試験等が挙げられ、生殖発生毒性試験、遺伝毒性試験、がん原性試験等は通常必要ないと考えられる。また、遺伝子治療薬にはプラスミド、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、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も考察した。

C.5 医薬品一般試験法の国際調和を促進するための研究

本分担研究では、薬局方一般試験法の国際調和を推進するための研究の一環として、①日局 16 での製剤総則の大改正により今後整備が必要と考えられる製剤試験法のリストアップと欧米薬局方でのこれら試験法の収載状況の調査、②国際調和された薬局方製剤試験の日米欧三薬局方の試験法の記載の現状、③製造工程評価に関する日米欧各薬局方の取り組みについて検討を行った。

21 年度は、第 16 日局改正とあわせて行われた、製剤総則の大幅な改正作業に伴い、今後フォローすべき課題として、日局一般試験法として今後収載を急ぐべき製剤特性の試験法をまとめた。この中には、坐剤等における有効成

分の放出性試験、経皮吸収型製剤の放出速度試験、スプレー剤等の送達性試験のように、米国薬局方、欧州薬局方に既に収載されている試験がある。これらの試験については、これら諸外国の局方をもとにして、日局試験法を検討することが、国際調和の上でも妥当な方策と考えられる。

22年度は、国際調和されたとされている薬局方製剤試験の中で、医薬品の品質管理に適用されるケースの多い、①注射剤の不溶性微粒子試験法、②製剤均一性試験法、③崩壊試験法、④溶出試験法 について、現在の日米欧三薬局方の試験法の記載を比較し、相違する部分について考察した。その結果、これらの試験法は各局とも規制上の運用が長年行われて来ており、実際の製品への適用という点では、依然として相違が大きいことが確認された。今後さらなる調和に向けた努力、戦略が必要と思われた。

23年度は、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。

C.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

本分担研究では、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。

Q-IWG の活動目的は、Q8、Q9 及び Q10 の一貫した導入と実践を世界的に行うこと、及び、三つのガイドラインの相乗効果により大きな成果を上げることにある。2007年に、非公式会議が開催され、2011年11月のセビア会議まで9回のQ-IWG作業部会会議が行われた。

検討課題として、研究開発から生産までのライフサイクルを対象に、用語の共通理解、三つのガイドラインの相互関係の理解を進めること、申請資料の中にどの様に見えるのかといった調和の程度も課題として取り上げた。又、Q8、Q9 及び Q10 の導入・実践による、既存の ICH の品質ガイドラインへの影響の評価、さらに、コミュニケーションとトレーニングを、Q&A や教育資料の作成を通じ行った。

具体的な活動として、2010年10月までに46のQ&Aを発行した。『Batch release という市場への出荷時の最終的な判断は、Real Time Release Testing (RTRT) を行うか、品質の試験、つまり規格の試験をするかに関わらず、GMP ルールの下で Batch release は行われる。』という原則を確認した。又、Q10 に定義されている知識管理は新しい概念ではなく、Q8、Q9 及び Q10 の発行に関わらず重要である。しかし Enhanced approach、QbD、あるいは PAT を採用した場合は、より複雑な内容を扱うため、より知識管理の重要度が上がると注意喚起した。さらに GMP 査察においては、製造プロセスと研究開発で得られた知識の關係に焦点が当てられる。このように、Q&A は複数の領域に渡る課題について、方針を明確にしつつ、解説を行った。Q&A は単独のガイドラインよりも明確に疑問に答えることができるが、実際の状況は Q&A の発行だけでは、説明しきれないため、QIWG が自ら作成した資料にもとづき、2010年には日米欧で教育研修会を開催した。

研修会の結果をもとに、管理戦略（control

strategy), Critical / Non-critical, 申請資料の程度 (内容と量), QbD 下におけるモデル化の役割, デザインスペース, プロセスバリデーション/プロセスベリフィケーションの6つのテーマに関してそれぞれ2・3ページの Points to Consider (PtC)を2011年に作成した。

作成された PtC には重要点が記述され、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、課題を中心にした個別の組み立てが必要となる。今後も事例研究を通じ、新薬だけでなく、既存の医薬品にも QbD の考え方が適用され、高度な品質管理が進展することが望まれる。

C.7 臨床試験における海外の規制状況の調査研究

本分担研究は、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することを目的として行った。

平成21年度は、2005年から開始された欧州における医薬品販売承認の更新制度、欧州及び米国における添付文書の承認上の位置づけを中心に文献調査及び関連機関への訪問調査を行った。22年度は欧州の承認更新制度の運用状況に係る調査を継続するとともに、米国における医薬品の市販後臨床試験の実施及び管理に係る規制制度について調査研究した。23年度は欧州の承認更新制度の運用状況、米国の医薬品市

販後の有効性、安全性確保のための制度のうち、特に市販後試験の実施及び管理の実態、既承認医薬品の承認取消し及び取下げの手続き、欧州及び米国における条件付き承認制度に関して文献調査及び訪問調査を行った。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。

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、米国でも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。このためには、欧米の制度及び運用を参考にしつつ、我が国の医療実態を加味した上で、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を行っていく必要がある。

D. 結論

本研究により、バイオ医薬品、バイオ後続品、遺伝子治療薬、化学薬品などの医薬品の品質・特性解析法、医薬品一般試験法や医薬品規制に関するガイドライン等の国際調和の推進に寄与する成果が得られた。

E. 健康危険情報

該当なし

F. 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*, 2010; 4, 11-19
- 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*, 2011;39, 328-332
 - 4) T. Arato, T. Yamaguchi: Experience of reviewing the follow-on biologics including Somatropin and erythropoietin in Japan, *Biologicals*, 2011; 39, 289-292
 - 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, 2011;42-52
 - 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, 2011; 3-15
 - 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, 2011; 67-77
 - 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*, 2011; 39, 3, 171-180
 - 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*, 2011; 42, 5, 444-447
 - 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*, 2011; 62, 6, 2633-2638
 - 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*, 2011; 62, 6, 113-118
 - 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*, 2011; 42, 827-83
 - 13) 石井明子, 多田 稔, 川崎ナナ：バイオ医薬品の品質・安全性評価シリーズ（第5回）バイオ医薬品の生産用基材, *ファームテクジャパン*（印刷中）
 - 14) 新見伸吾, 石井明子, 川崎ナナ：バイオ医薬品の品質・安全性評価シリーズ（第3回）バイオ医薬品の不純物の評価（1）, *ファームテクジャパン*, 28 (3), 43-48 (2012)
 - 15) 新見伸吾, 石井明子, 川崎ナナ：バイオ医薬品の品質・安全性評価シリーズ（第4回）バイオ医薬品の不純物の評価（2）, *ファームテクジャパン*, 28 (4), 113-119 (2012)
 - 16) 橋井則貴, 中澤志織, 川崎ナナ：再生医療製品の品質評価におけるグライコミクス, *薬学雑誌*, 132 (4), 395-530 (2012)
 - 17) 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)
- 18) 橋井則貴, 原園 景, 川崎ナナ: バイオ医薬品の品質・安全性評価シリーズ(第1回) バイオ医薬品の物理的・化学的性質解析の現状, *ファームテックジャパン*, 27 (13), 99-104 (2011)
- 19) T. Suzuki, A. Ishii-Watabe, M. Tada, T. Kobayashi, T. Kanayasu-Toyoda, T. Kawanishi, and T. Yamaguchi: Importance of FcRn in regulating the serum half-life of therapeutic proteins containing the Fc domain of human IgG1: A comparative study of the affinity of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins to human FcRn. *J. Immunol.* 184(4), 1968-76 (2010)
- 20) 2) 山口照英, 石井明子: 早期臨床開発段階でのバイオ医薬品の品質・安全性確保, *臨床評価* 36, 611-627 (2009)
- 21) 3) A. Ishii-Watabe, Y. Saito, T. Suzuki, M. Tada, M. Ukaji, K. Maekawa, K. Kurose, N. Kaniwa, J. Sawada, N. Kawasaki, T. Yamaguchi, T. Eguchi Nakajima, K. Kato, Y. Yamada, Y. Shimada, T. Yoshida, T. Ura, M. Saito, K. Muro, T. Doi, N. Fuse, T. Yoshino, A. Ohtsu, N. Saijo, T. Hamaguchi, H. Okuda, Y. Matsumura: Genetic polymorphisms of *FCGRT* encoding FcRn in a Japanese population and their functional analysis. *Drug Metab. Pharmacokine* 25(6), 578-587 (2010)
- 22) 石井明子, 鈴木琢雄, 多田 稔, 川西 徹, 山口照英, 川崎ナナ: 抗体医薬品の体内動態制御に関わる受容体: FcRn, *日本薬理学会誌*, 136(5), 280-4 (2010)
- 23) 石井明子, 川崎ナナ: バイオ治療薬の品質
安全性確保, *ファームテックジャパン*, 16, 69-80 (2010)
- 24) Kita, T., Nishida, H., Shibata, H., Niimi, S., Higuti, T., Arakaki, N.: Possible role of mitochondria remodeling on cellular triacylglycerol accumulation. *J. Biochem.*, 146, 787-796 (2009)
- 25) Shibata, H., Nakano, T., Parvez, MA., Furukawa, Y., Tomoshi, A., Niimi, S., Arakaki, N., and Higuti, T.: Triple combination of lower and longer alkyl gallates and oxacillin improve antibiotic synergy against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 53, 2218-2220 (2009)
- 26) Niimi, S., Harashima, M., and Hyuga, M.: Current Status of Therapeutic Angiogenesis with Protein, Gene and Cell Therapy, *Current Drug Therapy*, 4, 221-233 (2009)
- 27) 新見伸吾, 原島 瑞, 日向昌司, 山口照英: RNA interference を用いた医薬品開発の現状と展望, *医薬品研究*, 40 (12), 789-809 (2009)
- 28) 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1 *医薬品研究*, 40(11) 703-715 (2009)
- 29) 新見伸吾, 原島 瑞, 日向昌司, 山口照英: 治療用タンパク質の免疫原性 その2, *医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス*, 41(5) 390-400 (2010)
- 30) 新見伸吾, 原島 瑞, 日向昌司, 川崎ナナ: 治療用タンパク質の免疫原性 その3, *医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス*, 41(9) 726-735(2010)
- 31) Gotoh, Y., Ishizuka, Y., Matsuura T., Niimi S.: Spheroid formation and expression of liver-specific functions of

- human hepatocellular carcinoma-derived FLC-4 cells cultured in lactose-silk fibroin conjugate sponges. *Biomacromolecules*, 12 (5), 1532-1539 (2011)
- 32) 新見伸吾、原島 瑞、日向昌司、川崎ナナ：治療用タンパク質の免疫原性 その 4, *医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス*, 42(9), 818-826 (2011)
- 33) 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)
- 34) 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)
- 35) 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)
- 36) T. Yamaguchi and E. Uchida: Oncolytic Virus: Regulatory Aspects from Quality Control to Clinical Studies, *Current Cancer Drug Targets* (in press)
- 37) 内田 恵理子：遺伝子治療薬, “バイオ医薬品”, 西島正弘・川崎ナナ編、化学同人 (in press)
- 38) K. Nishimura, M. Sano, M. Ohtaka, B. Furuta, Y. Umemura, Y. Nakajima, Y. Ikehara, Toshihiro K., H. Segawa, S. Takayasu, H. Sato, K. Motomura, E. Uchida, T. Kanayasu-Toyoda, M. Asashima, H. Nakauchi, T. Yamaguchi and M. Nakanishi: Development of defective and persistent sendai virus vector: a unique gene delivery/expression system ideal for cell reprogramming, *J. Biol.Chem*, 286, 4760-4771 (2011)
- 39) 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)
- 40) 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
- 41) 山口照英、内田恵理子：核酸医薬品の開発動向とその品質・安全性確保, *Pharmstage*, 9 (2), 1-5 (2009)
- 42) Izutsu, K., Kadoya, S., Yomota, C., Kawanishi, T., Yonemochi, E., Terada, K.: Freeze-drying of proteins in glass solids formed by basic amino acids and dicarboxylic acids, *Chem Pharm Bull*, 57, 43-48 (2009)
- 43) Aso, Y., Yoshioka, S., Miyazaki, T., Kawanishi, T.: Feasibility of ¹⁹F-NMR for Assessing the Molecular Mobility of Flufenamic Acid in Solid Dispersions, *Chem Pharm Bull*, 57, 61-64 (2009)
- 44) Sakamoto, T., Matsubara, T., Sasakura, D., Takada, Y., Fujimaki, Y., Aida, K., Miura, T., Terahara, T., Higo, N., Kawanishi, T., Hiyama, Y.: Chemical mapping of tulobuterol in transdermal tapes using microscopic laser Raman spectroscopy, *Pharmazie*, 64, 166-171 (2009)

- 45) Izutsu, K., Hiyama, Y., Yomota, C., Kawanishi, T.: Near-infrared analysis of hydrogen-bonding in glass- and rubber-state amorphous saccharide solids, *AAPS PharmSciTech*, 10, 524-529 (2009)
- 46) Shibata, H., Saito, H., Yomota, C., Kawanishi, T.: Pharmaceutical quality evaluation of lipid emulsions containing PGE1: alteration in the number of large particles in infusion solutions, *Int J Pharm*, 378, 167-176 (2009)
- 47) Sakamoto, T., Portieri, A., Taday, P. F., Takada, Y., Sasakura, D., Aida, K., Matsubara, T., Miura, T., Terahara, T., Arnone, D. D., Kawanishi, T., Hiyama, Y.: Detection of tulobuterol crystal in transdermal patches using terahertz pulsed spectroscopy and imaging, *Pharmazie*, 64, 361-365 (2009)
- 48) Izutsu, K., Kadoya, S., Yomota, C., Kawanishi, T., Yonemochi, E., Terada, K.: Stabilization of protein structure in freeze-dried amorphous organic acid buffer salts, *Chem Pharm Bull*, 57, 1231-1236 (2009)
- 49) 川西徹: 後続品の評価 *ファルマシア* 45, 553-558 (2009)
- 50) Kadoya, S., Fujii, K., Izutsu, K., Yonemochi, E., Terada, K., Yomota, C., Kawanishi, T.: Freeze-drying of proteins with glass-forming oligosaccharide-derived sugar alcohols, *Int J Pharm*, 389, 107-113, (2010)
- 51) H. Shibata, C. Saito, C. Yomota, T. Kawanishi: Ammonium ion level in serum affects doxorubicin release from liposomes. *Pharmazie*, 651, 251-253 (2010)
- 52) K. Izutsu, K. Fujii, C. Katori, C. Yomota, T. Kawanishi, Y. Yoshihashi, E. Yonemochi, K. Terada: Effects of solute miscibility on the micro- and macroscopic structural integrity of freeze-dried solids, *J. Pharm. Sci.* 99, 4710-4719 (2010)
- 53) Sakai-Kato, K., Saito, E., Ishikura, K., Kawanishi, T.: Analysis of intracellular doxorubicin and its metabolites by ultra-high-performance liquid chromatography, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 878, 1466-1470 (2010)
- 54) 川西 徹: バイオ後続品の開発状況とその評価, *ジェネリック研究*, 4, 5-18 (2010)
- 55) 川西 徹: 製剤総則の改正, *薬局* 62, 2598-2605 (2011)
- 56) 川西 徹: 製剤試験法, *薬局* 62, 2654-2657 (2011)
- 57) 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)
- 58) 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)
- 59) 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).
- 60) Izutsu, K., Yomota, C., Kawanishi, T.:

- Impact of heat treatment on the physical properties of noncrystalline multisolite systems concentrated in frozen aqueous solutions, *J. Pharmaceut.Sci.*, 100, 5244-53, (2011)
- 61) Sakai-Kato, K., Ota, S., Takeuchi, T., Kawanishi, T.: Size separation of colloidal dispersed nanoparticles using a monolithic capillary column., *J Chromatogr A.*, 1218, 5520-6, (2011)
- 62) 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)
- 63) 川西徹：製剤総則の改正概要とその影響、*ファームテクジャパン*、27, 15-22 (2011)
- 64) 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)
- 65) 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)
- 66) 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)
- 67) 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)
- 68) Yukio Hiyama: Quality Topics Q-IWG* Quality Implementation Working Group, Proceeding of ICH Public Meeting: ICH Japan Symposium 2009, 114-122 (2009)
- 69) Tsuyoshi Ando, Yukio Hiyama, Yoshihiro Matsuda, Tamiji Nakanishi, and Haruhiro Okuda: *Pharmaceutical Technology*, 33, 72 (2009)
- 70) 檜山行雄：品質に関するトピックに動向、Q-IWG:品質実施作業部会、*医薬品研究*、40, 848-852 (2009)
- 71) 檜山行雄：医薬品規制国際調和会議 Q-IWGの活動、*PDA Journal of GMP and Validation in Japan*, 11(2), 56-61(2010)
- 72) 檜山行雄：欧州(エストニア・タリン市)におけるICH教育研修会を終えて、*医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス*、41, 756-768(2010)
- 73) 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) 川崎ナナ：糖タンパク質性医薬品の開発と質量分析。第7回日本糖質科学コンソーシアムシンポジウム、大阪(2009.2)
- 2) 川崎ナナ：臨床試験に向けたバイオ医薬品の品質管理。第1回レギュラトリーサイエンス学会学術集会、東京(2011.9)
- 3) 川崎ナナ：バイオ医薬品開発動向と課題。日本薬学会第132年会シンポジウム、札幌(2012.3)
- 4) 多田 稔、石井明子、鈴木琢雄、斎藤嘉朗、川崎ナナ：FCGRT 遺伝子多型解析により見出された Neonatal Fc receptor (FcRn) 変異体の機能解析、BMB2010(第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会) 神戸(2010.12)
- 5) 多田 稔、石井明子、鈴木琢雄、豊田淑江、川崎ナナ：複合体形成能に着目した抗TNF α 抗体医薬品の生物活性評価に関する研究、日本薬学会第131年会静岡(2010.3)
- 6) 多田 稔、石井明子、鈴木琢雄、川崎ナナ：Fc γ 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 札幌 (2012. 3)
- 7) 後藤洋子、石塚保行、松浦知和、新見伸吾: ラクトース修飾絹フィブロインのスポンジ基材で培養したヒト肝癌細胞株 FLC-4 細胞のスフェロイド培養と機能発現. 第 18 回ポリマー材料フォーラム、名古屋 (2009. 11)
 - 8) 原島 瑞、新見伸吾、江添悠、日向昌司、関泰一朗、有賀豊彦、山口照英: 初代培養肝細胞において HGF と Annexin A3 はプロスタグランジン E2 の産生を促進しない 第 82 回 日本生化学会大会、神戸 (2009. 10)
 - 9) 原島 瑞、新見伸吾、長岡陽子、斉藤千恵子、布留川みなこ、関泰一朗、有賀豊彦、山口照英: 初代培養ラット肝細胞における Dexamethasone 依存的な mRNA レベルの増加のプロテアソーム阻害剤による阻害 第 16 回 肝細胞研究会 山形 (2009. 6)
 - 10) 原島 瑞、日向昌司、関泰一朗、有賀豊彦、川崎ナナ、新見伸吾: 初代培養肝細胞において Annexin A3 は細胞周期阻害因子である P16^{INK4A} の発現を抑制することにより肝細胞増殖を促進する、第 83 回 日本生化学会大会、神戸 (2010. 12)
 - 11) 原島 瑞、日向昌司、長岡陽子、斉藤千恵子、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. 9)
 - 12) 新見伸吾: 生物薬品の免疫原性と安全性について、全国衛生化学技術協議会年会、長野(2011. 11)
 - 13) 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、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、東京 (2012.2)
 - 14) 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-、薬事エキスパート研修会、第 4 回品質/科学技術特別研修、大阪 (2012.3)
 - 15) Shingo Niimi : Risk factors of immunogenicity and their mitigation, Immunogenicity Seminar 2012, 東京 (2012.3)
 - 16) 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, USA (2011.5)
 - 17) 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、横浜 (2011. 12)
 - 18) 小木美恵子、西脇基晃、桜井貴裕、内田恵理子、會澤康治、得永嘉昭: 新規遺伝子導入法としてのレーザ誘起応力波の開発、第 56 回 音波と物性討論会、京都(2011. 7)
 - 19) 小木 美恵子、西脇 基晃、會澤 康治、内田 恵理子、得永 嘉昭: 遺伝子導入用インパルス応力波の創発に関する基礎研究、日本音響学会 2011 年春季研究発表会、東京(201. 3)
 - 20) 小木美恵子、石丸幸大、西脇基晃、宮脇 英明、内田恵理子、得永嘉昭: 遺伝子導入用インパルス応力波素子開発のための実験的検討、電子情報通信学会超音波研究会、京都 (2011. 1)
 - 21) 古田美玲、内田恵理子、豊田淑江、中西真人、西村健、大高真奈美、山口照英: 持続

- 発現型センダイウイルスベクターの CGD 遺伝子治療への応用、第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2010), 神戸 (2010.12)
- 22) Yukio Hiyama : Quality Topics Q-IWG: Quality Implementation Working Group, ICH Tokyo Symposium 2009, Tokyo (2009.6)
- 23) 檜山行雄: “ICH Q8 「製剤開発」, Q9 「品質リスクマネジメント」, Q10 「医薬品品質システム」 の背景など”、日本 PDA 製薬学会 教育コース 「ICH Q トリオの内容解説」 東京 (2009.12)
- 24) 奥田晴宏、檜山行雄: ICH Q8、Q9、Q10 における RTR、第九回医薬品品質フォーラムシンポジウム『リアルタイムリリースの実現に向けて』 東京 (2010.1)
- 25) 檜山行雄: ICH Q8、Q9、Q10 の実践導入について、大阪 (2011.1)
- 26) 檜山行雄: Q8、Q9、Q10 の接続、ICH 研修会、東京 (2011.4)
- 27) Yukio Hiyama: Process Validation and Continuous Process Verification, APEC DIA シンポジウム、ソウル(2011.4)
- 28) 檜山行雄: イントロダクション Quality by Design について第 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』 東京 (2011.11)

G. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

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 バイオ医薬品の品質管理における QbD の推進を目的としたケーススタディを実施するため、組換えヒト FSH 及び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。組換えヒト FSH については、FSH 高発現株及び精製用抗体を開発し、LC/MS を用いて目的としたアミノ酸及び糖組成からなる糖タンパク質が得られたことを確認した。また、生物活性を評価するため、レポーター遺伝子アッセイ/SPR イムノアッセイを利用した比活性測定法を開発した。トラスツズマブについては、トラスツズマブ安定発現 CHO 細胞株を樹立し、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 段階の精製工程からなる実験的製造を試みた。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、SPR イムノアッセイ、ELISA、及び定量 PCR を用い、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、組換えヒト FSH 及び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・品質管理にも、クオリティバイデザイン (QbD) が取り入れられるようになり、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の設定にも関心が高まっている。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。平成 21 及び 22 年度は、モデルとして、糖鎖構造や活性の研究が進んでいる FSH に着目し、実験的製造システムを構築し、糖鎖構造と活性の変動の解析した。また、平成 23 年度は、モデルとして、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

ラスツズマブに着目し、実験的製造システムを構築した。

B. 研究方法

B.1 組換えヒト FSH に関する研究

B.1.1 ヒト FSH α 鎖発現ベクターおよびヒト FSH β 鎖発現ベクターの作製

ヒト FSH α 鎖 (NM_000735) および FSH β 鎖 (NM_000510.2) の cDNA は、Origene 社より入手し、PCR 法でコーディング領域全長をそれぞれ増幅して断片を得た。PCR 法で調製したヒト FSH α 鎖断片および FSH β 鎖断片を、クローニングサイトで切断後末端をトポイソメラーゼ付加された発現ベクター、pOpti-VEC (Invitrogen) および pcDNA-3.3/Neo (Invitrogen) に組み込み、クローニングした (pOpti-VEC-FSH α および pcDNA-3.3/Neo-FSH β , 図 1A, 1B)。挿入方向は制限酵素のマッピングで確認するとともに、挿入部分の塩基配列を確認した。

B.1.2 ヒト FSH α 鎖/FSH β 鎖発現株の作製

ヒト FSH α 鎖発現ベクター pOpti-VEC-FSH α および FSH β 鎖発現ベクター pcDNA-3.3/Neo-FSH β を CHO-DG44 細胞 (Invitrogen) にリポフェクトアミン (Invitrogen) 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、G418 (500 μ g/mL) およびメトトレキサート (50 nM) を添加した Opti-CHO 培地 (Invitrogen) で 2 週間セクションした後、限界希釈法で 48 株クローン化した。メトトレキサート濃度を 500 nM まで順次増加させた。

B.1.3 ヒト FSH α 鎖/FSH β 鎖の発現量の解析

各トランスフェクタントから Trizol (Invitrogen) を用いて RNA を抽出し、ランダムヘキサマーをプライマーとして Super-script III キットを用いて cDNA を調製した。

ヒト FSH α 鎖および FSH β 鎖に特異的なプライマーを設計し、Light Cycler Fast Start DNA Master PLUS SYBR Green I (Roche) を用いてリアルタイム PCR を行った。Ct 値から相対発現強度を算出し、GAPDH の発現強度で補正することで各クローンにおける相対発現量を求めた。

B.1.4 ヒト FSH のウェスタンブロット

培養上清および組換えヒト FSH (フォリスチム, シェリングプラウ) を 12.5% SDS-PAGE で分離、PVDF 膜に転写後、1 次抗体として抗ヒト FSH 抗体 (Leinco Technologies あるいはハイブリドーマ #57-5)、2 次抗体として Cy5 標識抗マウス IgG 抗体 (GE Healthcare) を用いて蛍光スキャナーで検出した。

B.1.5 抗ヒト FSH 抗体を産生するハイブリドーマの作製

ヒト下垂体から精製した FSH (MBL) を抗原としてマウスに免疫し、抗体価が上昇したことを確認した後、脾臓を取り出し、ポリエチレングリコール法でミエローマ細胞と融合させハイブリドーマを作成した。ハイブリドーマは限界希釈法でクローン化し、抗原とした FSH を固定化したプラスチックプレートを用いた ELISA によって抗体産生を確認した。

B.1.6 抗ヒト FSH 抗体の評価

BIACORE を用いて、組換えヒト FSH (フォリスチム, シェリングプラウ) を CM5 センサーチップに固定化し、ハイブリドーマ培養上清をインジェクトして結合させた。溶離液として 0.5 M NaCl, 4 M MgCl₂, 0.1 M Glycine-NaOH pH 10, 0.1 M citrate-NaOH pH 2.2 を順次インジェクトし、RU 値の減少から溶出量を推定した。

B.1.7 ヒト FSHR の発現ベクターの作製

ヒト FSHR 鎖 (NM_000145) の cDNA は、Origene 社より入手し、末端に Sgf I および

Pme I 部位を持つプライマーを用いた PCR 法でコーディング領域全長を増幅して断片を得た。Sgf I および Pme I で消化したヒト FSHR 断片を、pF9A CMV hRluc-neo Flexi (Invitrogen) の Sgf I/Pme I 部位に組み込み、クローニングした後、(pCMV-FSHR-hRluc, 図 1C) 挿入部分の塩基配列を確認した。

B.1.8 FSH 応答ルシフェラーゼ発現株の作製

CHO 細胞に cAMP レスポンスエレメント (CRE) をプロモーターに導入されたルシフェラーゼ発現ベクター pGL4.29 (Invitrogen, 図 1D) を導入し、ハイグロマイシン耐性を利用したセレクションの後、限界希釈法でクローン化した。CRE 応答ルシフェラーゼ発現株は、フォルスコリンを添加した際のルシフェラーゼ活性の誘導能を指標にスクリーニングした。

CRE 安定発現株に FSH のレセプター遺伝子発現ベクター pCMV-FSHR-hRluc をさらに導入し、G418 耐性を利用したセレクションの後、限界希釈法でクローン化した。FSHR 安定発現株は、FSH に依存したルシフェラーゼ活性の増加を指標にスクリーニングした。

B.1.9 FSH 応答ルシフェラーゼ発現株の評価

2×10^4 cells/well の CFL2 の細胞に、FSH の濃度を 4 IU から 9 段階の 4 倍希釈液をそれぞれ添加して 6 時間インキュベートした後、ピッカジーン試薬 (東洋インキ) を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。同じ実験を 4 回繰り返して実施し、X 軸に対数表示で濃度、Y 軸にバックグラウンドのルシフェラーゼ活性に対する相対活性をプロットした。得られた応答値から Excel 2003 (Microsoft) のソルバーを用いて 5 パラメータロジスティックモデルの近似式 $f(x) = \varepsilon + \frac{\alpha}{(1 + (X/\delta)^{-\gamma})^\beta}$ を用い各変数 (α : E_{max} , β : 非対称因子, γ : 傾き, δ : EC_{50} , ε :

Emin) をフィッティングさせた。算出されたパラメータ δ 値、すなわち EC_{50} 値を比活性とした。

B.1.10 抗 FSH 抗体カラムの作製

昨年度、本研究で樹立した抗 FSH 抗体を産生するハイブリドーマ (#3.22) を CD Hybridoma 培養液 (Invitrogen) で培養し、遠心分離で得た培養上清を濾過、濃縮した。培養上清濃縮液を HiTrap Protein G カラム (GE Healthcare) にアプライし、PBS で洗浄した後、0.1 M Glycine-HCl pH 3.0 で溶出、直ちに 0.1 M HEPES pH 9.0 で中和した。1000 倍量の PBS に対し一昼夜透析した。

NHS-activated HiTrap カラム (GE Healthcare) を 1 mM HCl で洗浄した後、抗体溶液を添加し、30 分間室温で放置した。PBS で洗浄した後、エタノールアミン溶液を添加し、室温で 30 分間ブロッキングした。再度、PBS で洗浄し、抗 FSH 抗体カラムとした。

B.1.11 培養工程

昨年度、本研究で樹立した組換えヒト FSH を安定に高発現する CHO-DG44 細胞株 (DGF1 細胞) を、10%ウシ胎仔血清を添加した Opti-CHO 培地 (S 培地) (Invitrogen)、あるいは無血清の Opti-CHO 培地 (SF 培地) に 1×10^6 個/mL で播種し、3~4 日間、8% CO_2 の気流下、37°C, 125 rpm で旋回培養した。

培養液を回収し、350 x g, 15 分間遠心分離し、培養上清と細胞を分離した。回収した細胞は、S 培地あるいは SF 培地に再懸濁後、細胞数を計測し、次の培養に用いた。この培養工程を 6 回繰り返して、ロット 1~6 とした。

B.1.12 精製工程

回収した培養上清は、6000 x g, 10 分間、遠心分離し、上清をポアサイズ 0.45 μm のフィルター (Millipore) で濾過した後、限外濾過膜 PELXL (Millipore) を用いたタンジェン