

通常、販売承認がひとたび更新されると、その後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。その判断基準については、ガイドライン<sup>2)</sup>において、①曝露量が少ない場合（とはいってもオーファンドラッグが全てこの対象になるわけではない）、②特別な安全性上の懸念がある場合、③その他（例外的状況下での承認品目、条件付き販売承認から通常の承認に移行した品目）の例が示されている。

現行の更新制度は2005年11月から施行されたものである。それ以前は、製品が販売されている間は（永久に）5年ごとに販売承認を更新する制度であったが、原則1回の更新に改められた。旧制度は、承認保持者、規制当局ともに業務量の負担が大きく、ベネフィットとのバランスがとれていなかったために見直されたものであり、そもそも更新制度を無くす案もあったようであるが、各方面の意見も踏まえて、原則として承認後1回の更新とする内容となったとのことである。市販後の安全監視に関しては、承認更新のタイミングを待たなくとも、PSUR（Periodic Safety Update Reports：定期的安全性最新報告）等の情報を基に適時の対応が行われているという点も背景としてあるようだ。

この販売承認の更新は、同一の有効成分・ブランドをベースとする製品群の大きな塊を単位として行われる。すなわち、含量違いの複数製剤は一つにまとめられ、有効成分が同一で同じブランド名がつけられ、同様の適応に用いられる製品（例えば普通錠と徐放錠）も一つと見なされる。ある製品について、最初の承認後に新たな効能が追加された場合は、当該追加効能について独立に承認が更新されるようなことはなく、あくまで製品ベースの措置である。

## (2) 更新申請の手続き

承認保持者は、期限の遅くとも6か月前までに更新申請を行わなければならない。期限の1年程度前に、更新申請のためのEMAとの予備的相談を持つことが推奨されている。EMAは、更新申請を受けて、大きな問題がなければ90日以内、承認保持者とやり取りを行わなければならないようなケースでも120日以内に更新処理を行うこととされている。更新申請に際して、申請者は1製品ごとに12,500ユーロの手数料を支払う。

更新申請で提出される資料は以下のとおりである。（ガイドライン<sup>3)</sup>）

- 申請書、その他の行政文書
- 製品情報（SPC、Labeling及びPL）の改訂案
- PSUR（最終のデータ固定時点から60日以内のもの）
- 専門家の陳述（臨床分野、品質分野及び非臨床分野）

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。（EC指令2001/83 第116条<sup>4)</sup>）

## (3) 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。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。この他、2011年には承認の更新が否決されたケースが1品目あった。

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。

## 2. 欧州における条件付き販売承認制度

### (1) 制度の概要

欧州において販売承認時に何らかの条件が付されるケースは、以下の(a)~(c)の3つに分けられる。

#### (a) 条件付き承認

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フア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>5)</sup>、ガイドライン<sup>6)</sup>)

これまでに本制度下で承認された品目は少なく、2011年12月時点において本制度下で承認・販売されている医薬品は9品目である。

#### (b) 例外的状況下での承認

使用される状況が非常に稀である、科学知識が追いつかない又は倫理的に試験実施が不可能などという理由で、販売承認申請に当たって申請医薬品の有効性、安全性に関する十分なエビデンスを提示できない場合に、特定の手続き・条件を付して販売承認を行うという制度である。この場合の条件には、市販後臨床試験の実施、使用する医療機関・医師の限定、医療関係者への注意喚起などが含まれる。

(a)の条件付き承認と異なるのは、例外的状況下での承認については、販売後に追加情報が収集されたとしても「通常の承認」に移行することは期待されておらず、このため販売承認に期限は設けられず通常の承認と同様に5年後の承認更新後は永久のものとなることである。(EC 規則 No.726/2004 第 14 条 8<sup>1)</sup>、ガイドライン<sup>7)</sup>)

これまでに本制度下で承認された医薬品は22品目ある。

#### (c) 非公式な条件付き承認

上述(a)、(b)に示す正式な特定の義務付き承認が行われる頻度は高くないが、実際にはほとんど全ての新薬について市販後に何らかの課題が課せられている(“follow-up measures”と呼ばれる)。内容としては、安全性監視に関するものの他、有効性や品質に関わるものもある。この課題には明確な法的根拠はなく、承認保持者(企業)からEMAに確約書(commitment letter)が提出されるという非公式なものである。課題の内容の一部はEPARにその概要が記載されることが通例とのことであるが、網羅的ではない。

#### (2) 条件が履行されなかった場合の対応

EC 指令には医薬品等の規制における罰則の規定があり、規制当局は、必要な場合には医薬品の販売承認を停止、取消し又は変更で

きることとされている（EC 指令 2001/83 第 116 条 4）。これは、条件違反のみならず、医薬品等の販売承認制度一般に適用される罰則の規定である。

しかし、実際にこの規定に基づく措置がとられたことはなく、例えば承認保持者が条件とされた臨床試験を規制当局と合意した期限内に実施できない場合には、非公式の協議を行い、その解決を図るという手続きで進められるとのことである。

### 3. 欧州における添付文書類と承認の関係

欧州では、製品情報\*は販売承認の対象となっており、これらを改訂する際には、原則として EMA の承認が必要となる。（EU 規則 726/2004 第 9 条 4(a)(d)、同第 10 条 1 ㉑）

\* 欧州では、以下の 3 種の資料をまとめて「製品情報」（Product Information）と呼ばれている。

#### ① SPC（Summary of Product Characteristics）

医療関係者への基本的な情報提供資料。日本の「添付文書」に当たるものと理解できる。

#### ② Labeling

医薬品の容器・包装（箱、アンプルなど）への表示

#### ③ PL（Package Leaflet）

患者向けに作成された説明資料。通常は、医薬品のパッケージ（箱など）に入っており、パッケージごと患者に渡される。

Labeling 及び PL は SPC の情報を基に作成されることから、以後は SPC の取扱いを中心に述べる。以下に、承認された医薬品について製剤そのものや SPC を変更する場合の取扱いルールを概説する。

（EC 規則 1234/2008 ㉑）

#### (a) Extension

製剤について一部変更が行われる場合であり、含量、剤形、投与経路の変更、有効成分の塩変更、製造方法の変更などが該当する。

通常承認審査プロセスを経る。

#### (b) Variation

提出した資料（SPC を含む）の変更が行われる場合であり、以下の 3 タイプに分類される。

##### ● 小さな変更（タイプ I A）：

製品の品質、安全性又は有効性に全く影響しない又はわずかな影響しかない変更。製造業者の連絡先の変更などの事務的事項の変更、製造所の削除、直接の容器包装以外の容器包装の変更であって安定性・安全性などに影響がない場合、規格値の厳格化などが該当する。

EMA に変更後 12 カ月以内に届け出る。

##### ● 小さな変更（タイプ I B）：

タイプ I A、タイプ II のいずれにも該当しない変更。

EMA に事前に届出をし、30 日以内に意見がなければ変更が受理されたことになる。

##### ● 大幅な変更（タイプ II）：

製品の品質、安全性又は有効性に大きな影響を与える可能性がある変更（ただし(a)の Extension には該当しないもの）。効能の追加又は変更、新たな情報に基づく SPC の大幅な変更、規格試験方法の変更、製造方法の変更などが該当する。

変更に先だち EMA の事前承認が必要となる（原則として 60 日以内に判断される）。

#### (c) SPC に変更を要しない範囲の Labeling/ PL の軽微変更

EMA に事前に届出をし、90 日以内に意見がなければ変更が受理されたことになる。

（EU 指令 2001/83 第 61 条(3) ㉑）

#### 4. 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し、市販後に企業が自主的に実施する試験は含まれない。

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。（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)）

（PMR（Post-Marketing Requirement）と呼ばれる。）

しかしながら、その行使に当たっては種々の制限が加えられており、新たな規定に基づきFDAが市販後臨床試験の実施を求めることができるのは、以下の全ての条件を満たす場合に限られる。（FDC Act 505(o)(3)）

- 適切な科学的データ（類薬に関する情報を含む）に基づいてその実施が必要と判断されること
- 新たに得られた安全性情報に基づいてその実施が必要と判断されること
- 市販後臨床試験の目的は以下のいずれかであること
  - 当該薬剤の使用に関連する既知の重篤なリスクを評価する
  - 当該薬剤の使用に関連する重篤なリスクのシグナルを評価する
  - 重篤なリスクの可能性が示唆されるケースにおいて予測できない重篤なリスクを同定する

さらに、この市販後臨床試験は①前向き介入臨床試験と②それ以外の試験（観察研究、動物試験など）に区別され、FDAが①前向き介入臨床試験の実施を要求できるのは、②それ以外の試験では十分に目的が達成できないと判断される場合に限られる。また、②それ以外の試験を要求できるのは、有害事象報告及び新たな安全監視システムでは十分に目的が達成できないと判断される場合に限られる。

##### (2) 市販後試験の実施及びそのフォローアップ状況

本制度の下では、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 9)

- －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。

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>10)</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。

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。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<sup>11)</sup>。

(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。

## 5. 米国における添付文書類と承認の関係

米国においては、labeling は販売承認の対象となっており、labeling の記載を含む承認事項の一部変更を行おうとする場合の手続きについては、変更の内容、影響の程度に応じて以下の(a)～(c)の3つのように規定されている。(CFR 314.70)

### (a) 大幅な変更

製剤の同一性、力価、質、純度又は効力に悪影響を与える可能性が大きい変更については、変更後の製品を出荷する前に当該変更に係る追加申請及び承認が必要である。

Labeling については、以下の情報の変更が該当する。

- 医薬品の名称、剤形、投与経路、警告(boxed warning)、効能・効果、用法・用量、剤形及び力価、禁忌、使用上の注

意 (warnings and precautions) 、相互作用、特殊集団における使用

(b) 中程度の変更

製剤の同一性、力価、質、純度又は効力に悪影響を与える可能性が中程度である変更については、変更後の製品を出荷する少なくとも 30 日前までに当該変更に係る追加申請が必要である。

Labeling については以下の情報が該当し、これらについては変更に係る追加申請の提出後であれば、変更後の製品が出荷可能とされている。

- 禁忌、警告、使用上の注意、副作用の追加又は強化
- 薬物乱用、依存、心理的影響、過量投与に関する記述の追加又は強化
- 製剤の使用時の安全性を高めることを意図した用法・用量指示の追加又は強化
- 誤った、誤解を招く又は根拠のない効能・効果又は有効性の主張の削除

(c) 軽微な変更

製剤の同一性、力価、質、純度又は効力に悪影響を与える可能性がわずかである変更については、次回の年次報告に記載すればよい。

Labeling については、以下の情報が該当する。

- 力価や剤形の変更を伴わない製剤の説明やその供給方法に関する情報の変更
- その他編集上の又はそれと同程度の軽微な変更

なお、2007 年 FDA 改正法による市販後安全対策強化の一環として、新たなに得られた安全性情報に基づいて、承認保持者に対して labeling の変更を要求する権限が FDA に付与されている。

6. 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

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の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

#### D. 考察

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、添付文書類と承認の関係、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研究し、将来の我が国での制度のあり方について検討した。

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る。また、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に記載され公表されるというプロセスが確保されている。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されており、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、情報が公表されるシステムが構築されている。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。しかしながら、現状では、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は十分には整備されていない。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、欧米の制度及び運用を参考にしつつ、我が国の関連規制の見直しが検討されるべきであろう。

添付文書類と承認の関係については、欧米では添付文書類は販売承認の対象と位置付け

られており、その改訂に当たっては原則として規制当局の事前承認が必要とされる。しかしながら、改訂の内容及びその影響の大きさに応じて、承認ではなく一定期間前の事前届出や年次報告等による事後報告による対応が認められており、機動性の面で問題は生じていない。我が国では、制度上は添付文書の情報は効能・効果、用法・用量の記載を除いて承認の対象とはされていないところ、実際には企業と規制当局の担当部局との合意の上で改訂作業が行われているのが実態ではあるが、手続きの透明性は高くはない。現在、添付文書の届出制度に関する検討が進行中であるが、変更の内容や影響度に応じた機動的な取扱いルールを期待したい。

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、いわば例外的な承認を制度化している点は興味深い。我が国にも、特例承認制度、承認時の条件付帯（いわゆる承認条件）という枠組みはあるが、適用対象が比較的限定されており、また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）も含めた検討が開始されることを期待する。

#### E. 結論

欧米における販売承認の更新、条件付き販売承認、添付文書類と承認の関係、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。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

(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) Reflection paper: Criteria for requiring one additional five-year renewal for centrally authorized medicinal products. EMEA Nov 2007.
- 3) Guideline on the processing of renewals in the centralized procedure. EMEA/CPMP Oct 2005.
- 4) Directive 2001/83/EC of the European parliament and the council of 6 November 2001. (EC 指令 2001/83)
- 5) 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)
- 6) 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.
- 7) Guideline on procedures for the granting of a marketing authorization under exceptional circumstances, pursuant to article 14(8) of regulation (EC) No. 726/2004. EMEA Dec 2005.
- 8) Commission regulation (EC) No.1234/2008 of 24 November 2008. (EC 規則 No.1234/2008)
- 9) 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.
- 10) Federal Register. Vol.76, No.150, Aug 4, 2011.
- 11) Search: Postmarket Requirements and Commitments for Human Drugs.  
<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/pmc/index.cfm>

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
山口照英	バイオ医薬品開発初期での品質・安全性確保	森下真莉子	次世代バイオ医薬品の製剤設計と開発戦略	シーエムシー出版	東京	2011	67-77
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	技術情報協会	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	東京	2011	3-15
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	日本医薬品等ウイルス安全性研究会	医薬品の品質管理とウイルス安全性	文光堂	東京	2011	42-52
新見伸吾	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	日本医薬品等ウイルス安全性研究会	医薬品の品質管理とウイルス安全性	文光堂	東京	2011	222-236
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	日本医薬品等ウイルス安全性研究会	医薬品の品質管理とウイルス安全性	文光堂	東京	2011	53-63
橋井則貴, 石井明子, 新見伸吾, 川崎ナナ	第1章第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	技術情報協会	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	2011	3-18 19-35
橋井則貴, 小林哲, 川崎ナナ, 鈴木琢雄, 多田稔, 石井明子	バイオ医薬品の特性解析	山口照英	先端バイオ医薬品の評価技術	シーエムシー出版	東京	2010	171-211
多田稔, 石井明子	トランスジェニック動物・植物由来タンパク質医薬品	山口照英	先端バイオ医薬品の評価技術	シーエムシー出版	東京	2010	81-98
内田恵理子	細胞基材のマイコプラズマ試験	山口照英	先端バイオ医薬品の評価技術	シーエムシー出版	東京	2010	151-167
川西徹	バイオ医薬品の製法変更と同等性／同質性評価	山口照英	先端バイオ医薬品の評価技術	シーエムシー出版	東京	2010	212-223

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
T. Yamaguchi, E. Uchida	Oncolytic Virus: Regulatory Aspects from Quality Control to Clinical Studies	<i>Current Cancer Drug Targets</i>			印刷中
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
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	<i>Int J Pharm</i>	423	401-409	2012
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(4)	43-48	2012
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
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	<i>薬学雑誌</i>	132(4)	395-530	2012
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
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
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
Yamaguchi, T., Arato, T.	Quality, Safety and Efficacy of Follow-on Biologics in Japan.	<i>Biologicals</i>	39	328-332	2011
Arato, T., Yamaguchi, T.	Experience of reviewing the follow-on biologics including Somatropin & EPO in Japan.	<i>Biologicals</i>	39	289-292	2011

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	<i>Biologicals</i>	39	328-332	2011
T 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	<i>Biomacromolecules</i>	12(5)	1532-1539	2011
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	Development of defective and persistent sendai virus vector: a unique gene delivery/expression system ideal for cell reprogramming	<i>J. Biol. Chem.</i>	286	4760-4771	2011
Sakai-Kato K, Ota S, Hyodo K, Ishihara H, Kikuchi H, Kawanishi T.	Size separation and size determination of liposomes.	<i>J. Sep. Sci.</i>	20	2861-2865	2011
Sakai-Kato, K., Ota, S., Takeuchi, T., Kawanishi, T.	Size separation of colloidal dispersed nanoparticles using a monolithic capillary column.	<i>J Chromatogr A.</i>	1218	5520-5526	2011
Izutsu, K. I., Yomota, C., Kawanishi, T.	Stabilization of liposomes in frozen solutions through control of osmotic flow and internal solution freezing by trehalose.	<i>J Pharm Sci</i>	100	2935-2944	2011
Izutsu, K., Yomota, C., Kawanishi, T	Impact of heat treatment on the physical properties of noncrystalline multisolite systems concentrated in frozen aqueous solutions	<i>J Pharm Sci</i>	100	5244-5253	2011

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.	<i>J Pharm Sci</i>	100	4413-4420	2011
Miyazaki, T., Aso, Y., Yoshioka, S., Kawanishi, T.	Differences in crystallization rate of nitrendipine enantiomers in amorphous solid dispersions with HPMC and HPMCP	<i>Int J Pharm</i>	407	111-118	2011
山口 照英	細胞治療薬の開発と創薬支援技術	<i>Bio Industry</i>	27	6-17	2011
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	2633-2638	2011
山口 照英	第16改正日本薬局方の改正点 医薬品各条の改正点・④ 生物薬品	薬局	62	2681-2686	2011
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	444-447	2011
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	827-835	2011
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	ファームテク ジャパン	27 (13)	99-104	2011
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
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	<i>Bull. Natl. Inst. Health Sci.</i>	129	55-60	2011
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
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
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
川西 徹	製剤総則の改正	薬局	62	2598-2605	2011

川西 徹	製剤試験法	薬局	62	2654-2657	2011
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
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	<i>J.Immunol.</i>	184 (4)	1968-1976	2010
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, Ken. Muro, T. Doi, N. Fuse, T. Yoshino, A. Ohtsu, N. Saijo, T. Hamaguchi, H. Okuda, Y. Matsumura	Genetic polymorphisms of <i>FCGRT</i> encoding Fc Rn in a Japanese population and their functional analysis.	<i>Drug Metab. Pharmacokine</i>	25(6)	578-587	2010
Urayama, T., Sapsutthipas, S. Tsujikawa, M., Yamashita, A., Nishigaki, H., Ibrahim, M.S., Hagiwara, K., Yunoki, M., Yasunaga, T., Yamaguchi, T., Ikuta, K.	Full-Length Sequences of One Genotype 4 and Three Genotype 3 Hepatitis E Viruses in Fecal Samples from Domestic Swine in Japan.	<i>The Open Veterinary Science Journal</i>	4	11-19	2010
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.	<i>Int J Pharm</i>	389	107-113	2010
H. Shibata, C. Saito, C. Yomota, T. Kawanishi	Ammonium ion level in serum affects doxorubicin release from liposomes.	<i>Pharmazie</i>	651	251-253	2010
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.	<i>J. Pharm. Sci.</i>	99	4710-4719	2010
Sakai-Kato, K., Saito, E., Ishikura, K., Kawanishi, T	Analysis of intracellular doxorubicin and its metabolites by ultra-high-performance liquid chromatography	<i>J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci</i>	878	1466-1470	2010
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	<i>YAKUGAKU ZASSHI</i>	130(2)	163-169	2010

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)	280-284	2010
石井明子、川崎ナナ	バイオ治験薬の品質安全 性確保	Pharm Tech Japan	16	69-80	2010
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
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
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
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
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
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
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
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
Shibata, H., Nakano, T., Parvez, MA., Furukawa, Y., Tomoshi, A., Niimi, S., Arakai, 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
Aso, Y., Yoshioka, S., Miyazaki, T., Kawanishi, T.	Feasibility of <sup>19</sup> F-NMR for Assessing the Molecular Mobility of Flufenamic Acid in Solid Dispersions	Chem Pharm Bull	57	61-64	2009
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

Izutsu, K., Hiyama, Y., Yomota, C., Kawanishi, T.	Near-infrared analysis of hydrogen-bonding in glass- and rubber-state amorphous saccharide solids	<i>AAPS PharmSciTech</i>	10	524-529	2009
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	<i>Int J Pharm</i>	378	167-176	2009
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	<i>Pharmazie</i>	64	361-365	2009
Izutsu, K., Kadoya, S., Yomota, C., Kawanishi, T., Yonemochi, E., Terada, K.	Stabilization of protein structure in freeze-dried amorphous organic acid buffer salts	<i>Chem Pharm Bull</i>	57	1231-1236	2009
Yukio Hiyama	Quality Topics Q-IWG* Quality Implementation Working Group, Proceeding of ICH Public Meeting	<i>ICH Japan Symposium 2009</i>		114-122	2009
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	<i>臨床評価</i>	36	611-627	2009
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	<i>Pharmstage</i>	9(2)	1-5	2009
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	<i>医薬品研究</i>	40(12)	789-809	2009
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	<i>医薬品研究</i>	40(11)	703-715	2009
川西 徹	後続品の評価	<i>ファルマシア</i>	45	553-558	2009
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	<i>医薬品研究</i>	40	848-852	2009

## Regular Article

### Genetic Polymorphisms of *FCGRT* Encoding FcRn in a Japanese Population and Their Functional Analysis

Akiko ISHII-WATABE<sup>1,a</sup>, Yoshiro SAITO<sup>2,3,b,\*</sup>, Takuo SUZUKI<sup>1</sup>, Minoru TADA<sup>1</sup>, Maho UKAJI<sup>2</sup>, Keiko MAEKAWA<sup>2,3</sup>, Kouichi KUROSE<sup>2,3</sup>, Nahoko KANIWA<sup>2,3</sup>, Jun-ichi SAWADA<sup>2,4,\*\*</sup>, Nana KAWASAKI<sup>1</sup>, Teruhide YAMAGUCHI<sup>1</sup>, Takako EGUCHI NAKAJIMA<sup>5,†</sup>, Ken KATO<sup>5</sup>, Yasuhide YAMADA<sup>5</sup>, Yasuhiro SHIMADA<sup>5</sup>, Teruhiko YOSHIDA<sup>6</sup>, Takashi URA<sup>7</sup>, Miyuki SAITO<sup>7</sup>, Kei MURO<sup>7</sup>, Toshihiko DOI<sup>8</sup>, Nozomu FUSE<sup>8</sup>, Takayuki YOSHINO<sup>8</sup>, Atsushi OHTSU<sup>8,9</sup>, Nagahiro SAJO<sup>10,††</sup>, Tetsuya HAMAGUCHI<sup>5</sup>, Haruhiro OKUDA<sup>2,4</sup> and Yasuhiro MATSUMURA<sup>11</sup>

<sup>1</sup>Division of Biological Chemistry and Biologicals, National Institute of Health Sciences, Tokyo, Japan

<sup>2</sup>Project Team for Pharmacogenetics, National Institute of Health Sciences, Tokyo, Japan

<sup>3</sup>Division of Medicinal Safety Sciences, National Institute of Health Sciences, Tokyo, Japan

<sup>4</sup>Division of Organic Chemistry, National Institute of Health Sciences, Tokyo, Japan

<sup>5</sup>Gastrointestinal Oncology Division, National Cancer Center Hospital, Tokyo, Japan

<sup>6</sup>Genetics Division, National Cancer Center Research Institute, National Cancer Center, Tokyo, Japan

<sup>7</sup>Department of Medical Oncology, Aichi Cancer Center Hospital, Nagoya, Japan

<sup>8</sup>Division of Gastrointestinal Oncology/Digestive Endoscopy, National Cancer Center Hospital East, Kashiwa, Japan

<sup>9</sup>Director of Research Center for Innovative Oncology, National Cancer Center Hospital East, Kashiwa, Japan

<sup>10</sup>Deputy Director, National Cancer Center Hospital East, Kashiwa, Japan

<sup>11</sup>Investigative Treatment Division, National Cancer Center Hospital East, Kashiwa, Japan

<sup>a,b</sup>Akiko Ishii-Watabe and Yoshiro Saito contributed equally to this work

Full text of this paper is available at <http://www.jstage.jst.go.jp/browse/dmpk>

**Summary:** Neonatal Fc receptor (FcRn) plays an important role in regulating IgG homeostasis in the body. Changes in FcRn expression levels or activity caused by genetic polymorphisms of *FCGRT*, which encodes FcRn, may lead to interindividual differences in pharmacokinetics of therapeutic antibodies. In this study, we sequenced the 5'-flanking region, all exons and their flanking regions of *FCGRT* from 126 Japanese subjects. Thirty-three genetic variations, including 17 novel ones, were found. Of these, two novel non-synonymous variations, 629G>A (R210Q) and 889T>A (S297T), were found as heterozygous variations. We next assessed the functional significance of the two novel non-synonymous variations by expressing wild-type and variant proteins in HeLa cells. Both variant proteins showed similar intracellular localization as well as antibody recycling efficiencies. These results suggested that at least no common functional polymorphic site with amino acid change was present in the *FCGRT* of our Japanese population.

**Keywords:** *FCGRT*; neonatal Fc receptor (FcRn); genetic polymorphism; novel non-synonymous variation

Received; July 19, 2010, Accepted; September 14, 2010, J-STAGE Advance Published Date; October 1, 2010

\*To whom correspondence should be addressed: Yoshiro SAITO, PhD, Division of Medicinal Safety Sciences, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan. Tel. +81-3-3700-9528, Fax. +81-3-3700-9788, E-mail: yoshiro@nihs.go.jp

\*\*Present address: Pharmaceuticals and Medical Devices Agency, Shin-Kasumigaseki Building, 3-3-2 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-0013, Japan.

†Present address: Department of Clinical Oncology, St. Marianna University School of Medicine, 2-16-1 Sugao, Miyamae-ku, Kawasaki-city 216-8511, Japan.

††Present address: Kinki University School of Medicine, 377-2 Ohno-Higashi, Osaka-Sayama City, Osaka 589-8511, Japan.

This study was supported in part by the Program for the Promotion of Fundamental Studies in Health Sciences from the National Institute of Biomedical Innovation, and by the Health and Labor Sciences Research Grants from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan, and by KAKENHI (20590167) from the Japan Society for the Promotion of Science (JSPS).

## Introduction

Neonatal Fc receptor (FcRn) is an immunoglobulin G (IgG) receptor related to major histocompatibility (MHC) class I molecules.<sup>1,2</sup> Like MHC class I, FcRn consists of a heavy chain with extracellular  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ , and  $\alpha 3$  domains followed by a transmembrane segment and a short cytoplasmic tail and non-covalently bound  $\beta 2$ -microglobulin ( $\beta 2m$ ). FcRn binds the Fc region of monomeric IgG. The FcRn heavy chain is encoded by *FCGRT*, which is located in chromosome 19q13.3 and comprises 6 exons.

In humans, FcRn expression has been observed in a wide variety of tissues including placenta, liver, kidney and vascular endothelium.<sup>1</sup> FcRn has multiple roles in the body such as absorption or secretion of IgG across the intestinal mucosa, and IgG recycling from endothelial cells. With regard to antibody recycling, FcRn binds to the Fc domain of IgG at acidic pH in endosomes after endocytosis, and recycles it back to the extracellular space via the exocytic pathway, thereby protecting IgG from intracellular degradation in lysosomes.<sup>2</sup> This mechanism contributes to the long serum half-life of IgG, and thus, IgG recycling activity is an important function of FcRn and could contribute to the efficacy of antibody therapeutics. Indeed, we previously reported that affinities of antibody therapeutics to FcRn were closely correlated with the serum half-lives reported in clinical studies.<sup>3</sup> The relatively short serum half-life of Fc-fusion proteins such as etanercept, a fusion protein consisting of the extracellular ligand-binding portion of the human tumor necrosis factor receptor linked to the Fc portion of human IgG1, is thought to arise from low affinity to FcRn.<sup>3</sup>

Genetic polymorphisms of genes related to drug metabolism and transport are one of the crucial factors for low-molecular-weight drugs. Pharmacokinetics or pharmacodynamics of biologicals including antibody therapeutics may also be influenced by genetic polymorphisms of transport or target proteins. In this context, changes in FcRn expression levels or activity caused by genetic polymorphisms of *FCGRT* may lead to interindividual differences in pharmacokinetics of antibody therapeutics. However, reports on *FCGRT* genetic polymorphisms in Japanese populations are lacking.

Here we sequenced the 5'-flanking region, all exons and their flanking regions of *FCGRT* from 126 Japanese subjects. We then examined the functional properties of two detected non-synonymous variations using mammalian expression systems focusing on intracellular localization and antibody recycling activities.

## Materials and Methods

**Human genomic DNA samples:** One hundred twenty-six Japanese cancer patients participated in this study. The ethical review boards of the National Cancer

Center, Aichi Cancer Center and the National Institute of Health Sciences approved this study. Written informed consent was obtained from all subjects. Genomic DNA for DNA sequencing was extracted from blood leukocytes.

**PCR conditions for DNA sequencing:** The following sequences obtained from GenBank were used for primer design and reference sequences: NW\_927240.1 (genome) and NM\_004107.3 (mRNA). For sequencing, two sets of long-range PCR were performed to amplify all 6 exons from 50 ng of genomic DNA with two sets of primers (0.5  $\mu$ M) designed in the promoter or intronic regions as listed in "1st PCR" of **Table 1**. We used LA-Taq with GC buffer I (0.05 U/ $\mu$ l, Takara Bio Inc., Shiga, Japan) to amplify from the 5'-flanking region to exon 3 and Z-Taq (0.025 U/ $\mu$ l, Takara Bio. Inc.) from exons 4 to 6, as described in **Table 1**. The 1st PCR conditions were 94°C for 5 min, followed by 30 cycles of 94°C for 30 sec, 60°C for 1 min, and 72°C for 2 min, and then a final extension at 72°C for 7 min for LA-Taq, and 30 cycles of 98°C for 5 sec, 55°C for 5 sec, and 72°C for 190 sec for Z-Taq. Next, each region was separately amplified in the 2nd PCR using the 1st PCR product as the template. We used LA-Taq with GC buffer I or II (0.05 U/ $\mu$ l) for amplifying regions from the 5'-flanking region to exon 3 and Ex-Taq (0.02 U/ $\mu$ l, Takara Bio. Inc.) from exons 4 to 6 as described in **Table 1**. The 2nd PCR conditions were 94°C for 5 min, followed by 30 cycles of 94°C for 30 sec, 60°C for 1 min, and 72°C for 2 min, and then a final extension at 72°C for 7 min for all regions. The PCR products were then treated with a PCR Product Pre-Sequencing Kit (USB Co., Cleveland, OH, USA) and directly sequenced on both strands using an ABI BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit ver. 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and the sequencing primers listed in **Table 1** (Sequencing). Excess dye was removed by a DyeEx96 kit (Qiagen, Hilden, Germany) and the eluates were applied to an ABI Prism 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems). All relatively low frequent variations ( $n \leq 5$ ) were confirmed by repeated sequencing analyses of PCR products generated from original (not amplified) genomic DNA. The nucleotide positions based on the cDNA sequence were numbered from the adenine of the translational initiation site or the nearest exons.

**Hardy-Weinberg equilibrium and linkage disequilibrium (LD) analyses:** Hardy-Weinberg equilibrium and LD analyses were performed by SNPalyze software ver. 7 (Dynacom Co., Yokohama, Japan). Hardy-Weinberg equilibrium was assessed by the  $\chi^2$  test and pairwise LDs between variations were obtained for the frequently used coefficients  $|D'|$  and rho square ( $r^2$ ).  $|D'|$  is used to assess the probability for past recombinations, and  $r^2$  is used as a parameter for the linkage between a pair of variations.

**Table 1.** Primers used for sequencing *FCGRT*

	Enzyme*	Amplified or sequenced region	Forward primer (5' to 3')	Reverse primer (5' to 3')	Amplified length (bp)
1st PCR	LA-GI	5'-flanking to Exon 3	CTCAGGCTGGTCCTTGAACCTCA	ATTAGCCAGTTATGGTGGTATG	5,244
	Z	Exons 4 to 6	CAAGTGTGGTGGTGGGCACCTA	GGGAGTTCGAGACCAGCCTGAT	3,788
2nd PCR	LA-GI	5'-flanking	CTGAACCAGCTGAACGTCCACT	CTGAGCGTGGTGGTGGGCCTGT	1,058
	LA-GII		ATAGAGGTGACAGTTGCACAGC	GGTCCAGACTGACAACAATGCC	1,477
	LA-GII	Exon 1	GAGCAGCAGCCTCCCACAGGAT	ACACAAGAGGCGACAGGTGGTT	1,017
	LA-GI	Exons 2 to 3	ATTGTTGTCACTCTGGACCG	GCTGCAGTGGGAGCTGATGGA	1,332
	Ex	Exons 4 to 5	CCAAGGAGGTGACATCTTGAGG	CATCTCTGGGTTTCTGTCTCCA	1,383
	Ex	Exon 6	CCGCTTGCCGCTGCTGATCCA	GAGCTGAGATCACGCAATTGTA	1,632
Sequencing		5'-flanking	CTGAACCAGCTGAACGTCCACT	CAGGGTCTGGCTCTGTCACTCA	
			GTGCAGAAATAGGCAAATCTATC	AACCACATCCTTCTGCTAGGAC	
			CGGGTTCAAGCAATTCTCCTGT	TTGAGGGTGTCTGCCGCTCAGG	
			GAGCAGCAGCCTCCCACAGGAT	CCTCCTCTCTCAGACCAGGAA	
			CCTGGGTCTGAGGGAGGAGT	CCTCCTCGTACCTGAAGAACIT	
		Exon 1	GGACTCTCAGCCTATCAAGT	ACACAAGAGGCGACAGGTGGTT	
			CCGCGGTGTCCCGGAGGAA		
		Exons 2 to 3	GTATCTGTCCCACTGCAGTCTA	AACTGAGGCAGGTGGGCATGAC	
		Exon 4	TGAGTCTCTGCACCTAGGAAG	AGTTAACAGCTCTTCAGACTCA	
		Exon 5	CCGCTTGCCGCTGCTGATCCA	GTCCTGTCTCCCAAGGCTCTGT	
		Exon 6	TCAGAGAGAGGTGGAGACAGAA	GATGTATAAAAAGTGGCAGGTTT	
			CCTTGGATCTCCCTCGTGGAG	TGGCTCACACTGTAATCCAC	
		GACGGAGTCTGTCTGTGTCT			

\*LA-GI: LA-Taq with GC buffer I, LA-GII: LA-Taq with GC buffer II, Z: Z-Taq, Ex: Ex-Taq.

#### Construction of FcRn expression plasmid:

Wild-type human FcRn cDNA was originally obtained from pME18SFL3 (AK075532) (Toyobo, Osaka, Japan). The coding region of FcRn cDNA subcloned into pcDNA3 was amplified by PCR, and then inserted into the EcoRI/SalI site of pEGFP-(C) plasmid. The resulting plasmid encodes hFcRn with C-terminally fused enhanced green fluorescent protein (EGFP) containing the eight amino acid-linker peptide VDSRGSRV between the two proteins. Mutations were introduced by an inverse PCR method. Primers consisted of 5'-AAG GCC CAA CCC AGC AGC CCT GGC TTT-3' (forward) and 5'-CAG GCG CAT GGA GGG GGG CC CTT CCA-3' (reverse) for R210Q, 5'-TCC ACC GTC CTC GTG GTG GGA ATC GTC-3' (forward) and 5'-CTT GGC TGG AGA TTC CAG CTC CAC CCT-3' (reverse) for S297T. The underlines indicate the mutated nucleotides. The variant plasmids were sequenced on both strands for the entire cDNA region to confirm the introduction of the mutation only at the target sites. Human  $\beta 2$  microglobulin ( $\beta 2m$ ) cDNA was obtained from pME18SFL3 (FCC106E07) (Toyobo).  $\beta 2m$  cDNA was subcloned into pcDNA3.1/

Hygro. The  $\beta 2m$  construct was used because FcRn becomes a heterodimer with  $\beta 2m$ , which is necessary for the proper intracellular localization of FcRn.<sup>4,5)</sup>

**Cell culture and plasmid transfection:** HeLa cells were cultured in DMEM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) supplemented with 10% fetal calf serum (Nichirei, Tokyo, Japan). The plasmids encoding the wild-

type or variant FcRn fused with EGFP along with the plasmid encoding  $\beta 2m$  were transfected into HeLa cells using Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. Plasmids encoding wild-type or variant FcRn fused with EGFP were used for all experiments, including the intracellular localization and antibody recycling activity of FcRn.

**Western blot analysis:** Wild-type and variant FcRn-EGFP transfected into HeLa cells in 35-mm-diameter dishes were lysed with 500  $\mu$ L of RIPA buffer [50 mM Tris HCl (pH 7.6), 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40 and 0.25% sodium deoxycholate] supplemented with protease inhibitors (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan). After incubation on ice for 30 min, the lysates were centrifuged at 15,000 rpm at 4°C for 20 min. An aliquot (3  $\mu$ L) of the supernatant was diluted in SDS-sample buffer and applied to 10% SDS-polyacrylamide gel. After electrophoresis, separated proteins were transferred onto polyvinylidene fluoride membrane. Immunochemical detection of FcRn-EGFP proteins was performed using rabbit anti-human FcRn antibody raised against a peptide antigen (residues 135–148, LNGEEFMNFDLKQG). Visualization of the proteins was achieved with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG antibody (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) and the ECL Plus Western blotting detection reagent (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden). Protein band densities measured by LAS-3000 (Fuji Film, Kanagawa, Japan) were quantified with Multi Gauge software (Fuji Film).

The relative expression levels are shown as means  $\pm$  SD of three separate transfection experiments. To verify that the samples were evenly loaded, the blot was reprobed with anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) antibody (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

**Fluorescent labeling of antibodies:** As a model antibody, we used infliximab, a clinically used chimeric anti-human TNF $\alpha$  antibody which has the Fc domain of human IgG1. The binding of infliximab to human FcRn was shown by surface plasmon resonance analysis in our previous study.<sup>3)</sup> Infliximab, kindly provided by Tanabe Pharmaceutical Co. Ltd. (Osaka Japan), was labeled with CypHer5 (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Sweden) by incubating with CypHer5E mono NHS ester in PBS containing 0.5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH 8.3) for 1 hr at room temperature. After the reaction, unbound dye was removed by dialysis in PBS. The protein concentration and degree of labeling were determined by spectrophotometry. IgY (Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, PA, USA) was also labeled with CypHer5 and used in control experiments.

**Imaging with fluorescence microscopy:** HeLa cells transfected with wild-type or variant FcRn-EGFP cDNA and the  $\beta$ 2m cDNA were cultured on 35-mm poly-L-lysine-coated glass-bottom dishes (0.08–0.12 mm thickness) (Matsunami, Osaka, Japan) for 2–4 days. The intracellular localization analyses of wild-type and variant FcRn-EGFP were carried out by confocal laser scanning fluorescence microscopy using a Carl Zeiss LSM510 system (Carl Zeiss, Jena, Germany). For co-localization experiments, wild-type or variant FcRn-EGFP-transfected HeLa cells were incubated with CypHer5-labeled infliximab diluted in cell culture medium containing 200 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0) for 2–3 hr at 37°C. Note that throughout this study, the cell culture media used for incubation with the labeled antibody was acidified (pH 6.0) to obtain enhanced incorporation of antibodies into the cells, as reported previously.<sup>6,7)</sup> The fluorescent signal was observed in neutral pH medium after washing the cells twice. The 488- and 633-nm laser lines were used to image FcRn-EGFP and CypHer5 labeled-infliximab, respectively.

**Biotin labeling of antibodies:** Infliximab and IgY were labeled with biotin using EZ-link sulfo-NHS-biotin (Pierce, Rockford, IL, USA). Antibodies and sulfo-NHS-biotin were mixed at the molar ratio of 1:20 and incubated for 60 min at room temperature. Biotinylated antibodies were purified using Zeba desalt spin column (Pierce). Protein concentration was determined by BCA protein assay (Pierce) using bovine serum albumin as a standard.

**Recycling assay:** HeLa cells were transfected with the wild-type or variant FcRn-EGFP construct along with the  $\beta$ 2m construct. The day after transfection, cells were seeded on 96-well plates at  $4 \times 10^4$  cells/well. After fur-

ther culturing for one day, recycling assays were performed. Hanks' balanced salt solutions (HBSS) (pH 6.0 and 7.4) were prepared supplemented with 10 mM MES (pH 6.0) and 10 mM Hepes (pH 7.4). The cells were washed with HBSS (pH 7.4) and pre-incubated with HBSS (pH 7.4) for 30 min at 37°C. After washing with HBSS, 10  $\mu$ g/ml of biotinylated infliximab diluted in HBSS (pH 6.0) containing 0.5% fish gelatin was added to each well. The cells were incubated at 37°C for 1 hr to allow the antibody to be incorporated into the cells. Cells were then washed five times with HBSS (pH 7.4). Then, HBSS (pH 7.4) supplemented with 2% ultra-low IgG FCS (Invitrogen) was added to each well and incubated at 37°C for the indicated periods of time. The supernatant was collected and subjected to ELISA for quantitating the recycled antibody. In order to determine the amount of biotinylated infliximab incorporated into the cells during the 1-hr incubation at 37°C, cells were lysed using RIPA buffer supplemented with protease inhibitors (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) after washing five times with HBSS, and the lysate was subjected to ELISA. Biotinylated IgY was also used as a negative control in some experiments.

**Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for biotinylated antibody:** NeutrAvidin (Pierce, Rockford, IL) was bound on Maxisorp 96-well black plates (Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Denmark) using IMMUNO-TEK ELISA construction system (Zep-toMetrix, Buffalo, NY, USA). Supernatants or lysates obtained from the recycling assay were applied on the wells and incubated for 16 hr at 4°C. The plates were washed three times with Tris-buffered saline (pH 7.6) containing 0.1% Tween-20 (TBST). Peroxidase-conjugated goat anti-human IgG (Pierce) diluted with TBST was added to the plate and incubated for 1 hr at room temperature. After washing three times with TBST, chemiluminescent reagent (SuperSignal ELISA Femto, Pierce) was added and incubated for 1 min at room temperature. The chemiluminescent signal was detected using an ARVO 1420 multilabel counter (Perkin Elmer, Waltham MA, USA). When the amount of biotinylated IgY was measured, peroxidase-conjugated rabbit anti-chicken IgY (Promega, Madison, WI, USA) was used. For generation of a standard curve, 0.1 to 10 ng/ml of biotinylated corresponding protein was used.

## Results

**FCGRT variations found in a Japanese population:** Thirty-three genetic variations were found, including 17 novel ones, in 126 Japanese subjects (Table 2). Of these variations, 14 were located in the 5'-flanking region, 4 (2 synonymous and 2 non-synonymous) in the coding exons, 13 in the introns, 1 in the 3'-untranslated region (UTR), and 1 in the 3'-flanking region. All detected variations were in Hardy-Weinberg equilibrium

**Table 2.** Summary of *FCGRT* variations detected in this study

SNP ID		Location	Position		Nucleotide change	Amino acid change or known VNTR	Frequency	
This Study	dbSNP (NCBI) or reference		NW_927240.1	From the translational initiation site or from the end of the nearest exon			95% Confidence interval	
MPJ6_FRT001 <sup>a</sup>		5'-flanking	1557122	-2230	agaacctgaactA > Ccctgaccagcag		0.004	0.000-0.012
MPJ6_FRT002 <sup>a</sup>			1557195	-2157	gggtgtcttcaC > Actgtcatcccag		0.008	0.000-0.019
MPJ6_FRT003	rs78889190		1557207	-2145	cctgtcatcccaG > Ctgtctgggagg		0.020	0.003-0.037
MPJ6_FRT004 <sup>a</sup>			1557221	-2131	gcttgggaggcC > Taaggtgggaggc		0.004	0.000-0.012
MPJ6_FRT005 <sup>a</sup>			1557498_1557505	-1854_-1847	ggaaggaggaaGGAAGGAA/-ggaggcaaggaa		0.024	0.005-0.043
MPJ6_FRT006	rs60964075		1557502_1557505	-1850_-1847	ggaaggaggaaGGAA/-ggaggcaaggaa		0.103	0.066-0.141
MPJ6_FRT007	rs60964075		1557505_1557506	-1847_-1846	ggaaggaggaaGGAA/-GGAAGgaggcaaggaa		0.099	0.062-0.136
MPJ6_FRT008 <sup>a</sup>			1557505_1557506	-1847_-1846	ggaaggaggaaGGAA/-GGAAGGAAggaggcaaggaa		0.020	0.003-0.037
MPJ6_FRT009 <sup>a</sup>			1557506	-1846	ggaaggaggaaG > Agaggcaaggaa		0.004	0.000-0.012
MPJ6_FRT010 <sup>a</sup>			1557540_1557547	-1812_-1805	aaggaggaggAAGGAAGG/-aggcaaggagg		0.004	0.000-0.012
MPJ6_FRT011	rs2335534	1557671	-1681	tctgggagcagcG > Agctgtttaacgg		0.028	0.007-0.048	
MPJ6_FRT012 <sup>a</sup>		1558366	-986	gatacagagggT > Gaggaggaggatc		0.004	0.000-0.012	
MPJ6_FRT013	ref. 8	1558963_1558999	-389_-353	cgaggtagagcGGTTGGGGGCCCGACTCCTGG GTCCGAGGGTAGAGC/-ggttggggccc	VNTR3 > VNTR2	0.032	0.010-0.053	
MPJ6_FRT014 <sup>a</sup>		1559173	-179	actgagatccagT > Gtcaggggtgaaa		0.028	0.007-0.048	
MPJ6_FRT015	rs59774409	Intron 1	1559442	IVS1 + 18	ggccgctcgggC > Tcagggcctgct		0.028	0.007-0.048
MPJ6_FRT016 <sup>a</sup>		1559453	IVS1 + 29	gccaggccctcC > Ttgaggcgggagc		0.147	0.103-0.191	
MPJ6_FRT017	rs11551281	Exon 2	1559885	126 <sup>b</sup>	ctgcctgcccG > Tgggactcctgcc	Pro42Pro	0.044	0.018-0.069
MPJ6_FRT018	rs2878342	Exon 3	1560418	582 <sup>b</sup>	ggagagggccgC > Tggaaacctggag	Arg194Arg	0.028	0.007-0.048
MPJ6_FRT019 <sup>a</sup>		Exon 4	1570485	629 <sup>b</sup>	gcctgaagcccG > Aaccagcagccc	Arg210Gln	0.004	0.000-0.012
MPJ6_FRT020	rs3810194	Intron 4	1570734	IVS4 + 7	agctgggtgaggT > Ccccaggtgg		0.048	0.021-0.074
MPJ6_FRT021	rs1132990	1570857	IVS4 + 130	gcctgaacctcA > Ggcctgtcagtg		0.048	0.021-0.074	
MPJ6_FRT022 <sup>a</sup>		1570915	IVS4 + 188	ccaactgccttcC > Tgtctcctgtgc		0.020	0.003-0.037	
MPJ6_FRT023	rs10525267	1571020_1571025	IVS4 + 293_+298	tgctgtgctgcTGCTGC/-gggtcttcctgg		0.083	0.049-0.117	
MPJ6_FRT024 <sup>a</sup>		1571170	IVS4-238	ctggcacagcccC > Tgcttgccgctg		0.020	0.003-0.037	
MPJ6_FRT025	rs73582442	1571235	IVS4-173	gctgttcttaC > Atccaacctgggg		0.048	0.021-0.074	
MPJ6_FRT026	rs73582446	1571314	IVS4-94	gctggaatctcC > Aaggctgggagg		0.048	0.021-0.074	
MPJ6_FRT027 <sup>a</sup>		Exon 5	1571425	889 <sup>b</sup>	ccagccaagtctT > Accgtctcgtgg	Ser297Thr	0.020	0.003-0.037
MPJ6_FRT028	rs55662447	Intron 5	1571614_1571615	IVS5 + 90_+91	agagaccagagAG/-ggggacagaga		0.028	0.007-0.048
MPJ6_FRT029 <sup>a</sup>		1571615	IVS5 + 91	gagaccagagagG > Tggggacagaga		0.004	0.000-0.012	
MPJ6_FRT030	rs77741672	1571691	IVS5 + 167	gagaggggacgG > Cagacagagacc		0.151	0.107-0.195	
MPJ6_FRT031 <sup>a</sup>		1571915	IVS5-46	gtcagaccagagG > Acccctcagat		0.020	0.003-0.037	
MPJ6_FRT032	rs14769	3'-UTR	1572276	1304 (*206) <sup>c</sup>	taacacgagttG > Aggcccaatcag		0.044	0.018-0.069
MPJ6_FRT033 <sup>a</sup>		3'-flanking	1572364	1312 + 80 (*214 + 80) <sup>d</sup>	tggcctcggatC > Ttctctacaggt		0.004	0.000-0.012

<sup>a</sup>Novel variations detected in this study.

<sup>b</sup>Positions in cDNA (NM\_004107.3).

<sup>c</sup>Numbered from the termination codon TGA.

<sup>d</sup>Positions were shown as 1312 (\*214) (final base of exon 6)+ bases from the end of exon 6.