

討を伴う初期の治験段階では、実施施設に制約があり実施に困難を伴うウイルスクリアランス工程評価試験を繰り返すことは必ずしも合理的でなく、安全確保と効率を見据えた適切な判断が必要である。バイオ治験薬のウイルス安全性について、2008年にEMAからガイドライン“Guideline on virus safety evaluation of biotechnological investigational medicinal products”が公表されている。このガイドラインでは、治験薬の特性を踏まえたウイルス安全性確保に関する考え方が述べられており、製造用細胞の特性と履歴、製造用細胞の特性解析の程度、製造工程におけるヒトや動物由来原料の使用状況、ウイルス迷入の可能性、製造用細胞に関する製造企業の経験、ウイルス除去工程に関する製造企業の経験、文献情報等を考慮して、治験の段階に応じた合理的な試験実施が可能であることが書かれている。

また、わが国では、生物由来原料基準により医薬品に使用される原料または材料に求められる要件が定められている。感染性物質混入のリスク低減のため、生物由来原料基準への適合性は事前に確認しておく必要がある。

工程パラメータの設定はCQAへの影響を中心に検討を行い、CQAに影響する工程パラメータを同定し、適切な範囲を検討する。開発初期では特に、立証された許容範囲として、各パラメータの許容範囲を独立して検討することでよいと考えられる。

工程内管理試験としては、原薬を用いた試験より工程内での試験が妥当と考えられた工程由来不純物の残存量の試験や、中間体の試験が考えられる。

#### (4) 製法変更時の同等性／同質性確保

医薬品の品質は、その製品ライフサイクルを通して維持あるいは改善されなければならない。これは、治験によって確認された有効性・安全性が市販製剤でも継続して担保されるために必須の要件である。しかし、治験段階では、開発の進展に伴い、スケールアップを含め種々の製法変更が実施されるため、品質に影響が生じる可能性がある。より高発現の細胞株を製造に用いるため、セル・バンクの変更が行われることもしばしばである。そのため、有効性・安全性に悪影響がないことを見極めながら、製法の改良を進めていく必要がある。

治験薬GMPでは、その目的1.3に関連して、「一貫性(consistency)」とは治験薬と市販後製品の共通点ならびに相違点およびその因果関係が明確にされていることであり、「同等性(equivalency)」とは治験薬と市販後製

品が品質、安全性および有効性について科学的に有意差が認められず、同等と判断しうること、と定義されている。バイオ医薬品では、目的物質の品質特性を高次構造や不均一性を含めて完全に解析することが困難であり、製法変更前後で品質が完全に同一であると判断できないため、同等性(equivalency)ではなく、ICH Q5Eガイドラインに従い、同等性／同質性(comparability)を評価する。

製造方法や試験方法を変更した場合は、その変更に伴う一連の文書を適切に保管してトレーサビリティを保持必要がある。また、ロットごとに、変更の際の比較評価試験に使用する量を勘案した上で、適切な量を参考品として保管しておく。

先に述べたとおり、非臨床安全性試験の結果が臨床試験に用いる治験薬でも有効であることを担保するために、非臨床試験と初回あるいは初期臨床試験は同じ製法のロットを用いることが望ましい。

### 5. 治験をめぐる今後の展望と バイオ治験薬の品質・安全性確保

治験に関する今後の動向として、探索的臨床試験の増加や、国際共同治験の増加が想定される。探索的臨床試験は開発候補薬物の絞り込みにも有用であると期待されており、平成22年に発出されたICH M3ガイドラインR2「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス」において早期探索臨床試験の項が設けられ、わが国においても「マイクロドーズ臨床試験の実施に関するガイダンス(薬食審査発第0603001号 平成20年6月3日)」が発出される等、関連したガイドラインの整備も進んでいる。

近年のバイオ医薬品の開発においては、天然型タンパク質の一部の構造改変、複数のタンパク質の機能ドメインの融合、化成品との共有結合等により、非天然型の構造を持つ製品を開発するケースが増加している。このような場合に、目的に合う優れた特性を示す候補品の見極めに、探索的臨床試験が有用な可能性も考えられる。早期探索的臨床試験では、その後の治験薬との一貫性は重要視されないと考えられるが、リスク要因を考慮し初回投与量の適切な算出に資する体内動態に関する情報の取得、作用機構の解明と力価測定法の確立が重要であると考えられる。

一方、国際共同治験は、ドラッグラグが社会的に問題

視されていること、現状では海外メーカーが先導的に開発を進めているバイオ医薬品が多いことから、今後増加することが予想される。これまでにバイオ医薬品で国際共同治験が実施された例として、トラスツズマブの乳がんに対する術後補助化学療法への効能追加の例がある<sup>9)</sup>。

国際共同治験を計画する場合の基本的な留意事項は、「国際共同治験に関する基本的考え方」に述べられているように、

- ・ 民族的要因が治験薬の有効性及び安全性に及ぼす影響
- ・ 国際共同治験のデザイン
- ・ 主要評価項目に関する参加地域間差
- ・ 有害事象の収集方法及び評価方法

である。

化学合成医薬品に関しては、安全性に影響する民族的要因として、薬物代謝酵素の活性低下・消失を伴う遺伝子多型の出現頻度が日本人と他人種で異なる例が報告されている<sup>10)</sup>。バイオ医薬品に関しても、有効性や安全性に関わる因子の遺伝子多型などの人種あるいは民族的要因に関する検討を進め、わが国におけるバイオ医薬品開発のための治験を安全に実施するために考慮すべき点について明らかにしていくことも必要であると考えられる。

## おわりに

現在、世界の医薬品市場におけるバイオ医薬品の割合は2割程度であるが、その市場成長率は医薬品市場全体の2倍であり、年率2桁の伸びを示している<sup>11)</sup>。バイオ医薬品は、先端技術応用医薬品として生命科学の研究成果を社会に還元し、国民の健康・安心に貢献する重要な役割を担っている。わが国では治験の空洞化が言われて久しいが、治験環境の充実に加えて、治験薬の品質・安全性確保の合理的な方策確立により治験が安全かつ効率的に実施され、有用なバイオ医薬品が迅速に創出されることが期待される。本稿が、バイオ治験薬の品質・安全性確保に関する議論の端緒となれば幸いである。

## 参考文献

- 1) 「新成長戦略」について、平成22年6月18日、閣議決定 [cited; Available from: <http://www.kantei.go.jp/jp/sinseic/housenryaku/sinseichou01.pdf>]
- 2) 古田土真一：第2章 治験薬のGMPの医薬品GMPとの相違および三極の相違、治験薬GMPハンドブック、じほう(2009)
- 3) 山口照英、石井明子：次世代バイオ医薬品の開発にあたっての非臨床・臨床試験について—TGN1412事故が医薬品開発に与えたインパクト、谷本学校「毒性質問箱」、10、1-33(2007)
- 4) Chung, C. H., Mirakhur, B., Chan, E., Le, Q. T., Berlin, J., Morse, M., Murphy, B. A., Satinover, S. M., Hosen, J., Mauro, D., Slebos, R. J., Zhou, Q., Gold, D., Hatley, T., Hicklin, D. J., Platts-Mills, T. A.: Cetuximab-induced anaphylaxis and IgE specific for galactose-alpha-1,3-galactose. *N Engl J Med.* 358: 1109-1117(2008)
- 5) Li, J., Yang, C., Xia, Y., Bertino, A., Glaspy, J., Roberts, M., Kuter, D. J.: Thrombocytopenia caused by the development of antibodies to thrombopoietin. *Blood.* 98: 3241-3248(2001)
- 6) EMA. Omnitrope; Scientific discussion. 2006 [cited; Available from: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Scientific\\_Discussion/human/000607/WC500043692.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Scientific_Discussion/human/000607/WC500043692.pdf)]
- 7) Boven, K., Stryker, S., Knight, J., Thomas, A., van Regenmortel, M., Kemeny, D. M., Power, D., Rossert, J., Casadevall, N.: The increased incidence of pure red cell aplasia with an Eprex formulation in uncoated rubber stopper syringes. *Kidney Int.* 67: 2346-2353(2005)
- 8) Knezevic, I., Stacey, G., Petricciani, J.: WHO Study Group on cell substrates for production of biologicals, Geneva, Switzerland, 11-12 June 2007. *Biologicals.* 36: 203-211(2008)
- 9) 荒戸照世：第12章 バイオ医薬品(タンパク質性医薬品)の臨床試験における留意点、先端バイオ医薬品の評価技術、シーエムシー(2010)
- 10) Saito, Y., Maekawa, K., Ozawa, S., Sawada, J.: Genetic polymorphisms and haplotypes of major drug metabolizing enzymes in east asians and their comparison with other ethnic populations. *Curr Pharmacogenomics.* 5: 49-78(2007)
- 11) 八木 崇：バイオ医薬品開発における潮流と規制 第1回 バイオ医薬品を取り巻く環境、PHARM TECH JAPAN, 26(4): 37-44(2010)

## 治療用タンパク質の免疫原性 その2<sup>\*1</sup>

新見 伸吾<sup>\*2</sup>, 原島 瑞<sup>\*3</sup>, 日向 昌司<sup>\*2</sup>, 山口 照英<sup>\*2</sup>

治療用タンパク質の免疫原性 その2<sup>\*1</sup>新見 伸吾<sup>\*2</sup>, 原島 瑞<sup>\*3</sup>, 日向 昌司<sup>\*2</sup>, 山口 照英<sup>\*2</sup>Immunogenicity of Therapeutic Proteins Part 2<sup>\*1</sup>Shingo NIIMI<sup>\*2</sup>, Mizuho HARASHIMA<sup>\*3</sup>,  
Masashi HYUGA<sup>\*2</sup> and Teruhide YAMAGUCHI<sup>\*2</sup>

## はじめに

1980 代に導入された組換え DNA 技術を用いて生産された組換えヒトタンパク質の各種疾患における使用は医薬品に革命をもたらした。現在、世界では 200 以上の高度に精製された治療用タンパク質が医療現場に提供されている。そのうちの 75%以上が組換えヒトタンパク質である<sup>1)</sup>。一部のモノクローナル抗体及び動物由来製品を除いて、これら治療用タンパク質のほとんどは、ヒト体内で産生されるタンパク質と同じアミノ酸配列を有する。したがって、このような製品では患者で抗体の産生が誘導されないことが期待される。しかし、予想に反して、これらの製品でも患者で抗体の産生が誘導されることが報告された<sup>2~5)</sup>。一般的に、抗原の抗体産生や細胞性免疫を誘導する性質を免疫原性と呼ぶ。本稿において、免疫原性とは、タンパク質治療薬を患者に投与した場合、その治療薬に対する特異的な抗体産生が誘導される性質を指す。

抗体の検出される頻度及び有害事象は製品により異なる。有害でない場合、抗体の出現は一過性であり、産生される抗体は非中和抗体であることが多い。しかし、特に中和抗体の場合は、有効性が低下し、臨床結果に悪影響を及ぼす可能性が高い。ほとんどの製品において、有害な抗体反応により影響を受ける患者の数は、治療患者全体に比べて少ない<sup>6)</sup>。免疫原性の高まる要因としては、

①異種タンパク質（キメラ及びヒト型治療用抗体等）、②宿主由来不純物（宿主由来タンパク質、エンドトキシン等）、③患者の特性（治療用タンパク質と相同の内在性タンパク質の産生欠損等）、④グリコシレーションの欠損等、⑤目的物質由来不純物（凝集体、酸化体、分解物、高次構造の変化体等）等がある<sup>7)</sup>。

これらの原因により、interferon (IFN)<sup>8~11)</sup>、granulocyte-macrophage colony-stimulating factor<sup>12)</sup>、第Ⅷ因子<sup>13)</sup>、成長ホルモン<sup>14,15)</sup>、各種のキメラ及びヒト型治療用モノクローナル抗体<sup>16)</sup>等、数多くの治療用タンパク質において、抗体産生が誘導される例が報告されている。また、慢性腎不全患者においてエリスロポエチンにより引き起こされる赤芽球癆<sup>17)</sup>、健常ボランティア及び癌患者において pegylated recombinant megakaryocyte growth and developmental factor により引き起こされる血小板減少症<sup>2)</sup>のように、抗体産生の誘導により、治療薬だけでなく内在性タンパク質が不活性化され、重篤な有害事象を及ぼす例も報告されている。

以上のような例は、治験あるいは承認後の臨床使用で初めて明らかになったものである。したがって、非臨床において免疫原性の可能性が予測されれば、治験における開発中止のリスクを回避でき、抗体産生を誘導する可能性の低いものに改変することも可能になるものと期待される。逆に、免疫原性が低いことが予測される場合は、治療用タンパク質の開発が続行可能であることを示唆す

<sup>\*1</sup> その1：医薬品研究, 40(11), 703~715 (2009)

<sup>\*2</sup> 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部 東京都世田谷区上用賀 1-18-1 (〒158-8501)

Division of Biological Chemistry and Biologicals, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

<sup>\*3</sup> 日本大学総合科学研究所 東京都千代田区五番町 12-5 (〒102-8251)

University Research Center, NIHON UNIVERSITY, 12-5 Gobanchō Chiyoda-ku, Tokyo 102-8251, Japan

る判断基準の一つとなりうる。このような観点から、治療用タンパク質の免疫原性の予測は有用と考えられる。

一方、2008年4月に欧州医薬品庁より公表されたバイオテクノロジー由来治療用タンパク質の免疫原性の評価のガイドラインでは<sup>18)</sup>、免疫原性の非臨床における評価は以下のように記載されている。「治療用タンパク質と動物における相同タンパク質の構造にはほとんどの場合種差がある。したがって、ヒトタンパク質は動物により外来タンパク質と認識される。このため、免疫原性を非臨床試験により予測できる可能性は低いと考えられる。ヒトにおける免疫原性の予測を目的とした非臨床試験は通常必要とされない。しかしながら、新たな技術（新規の *in vivo*, *in vitro*, *in silico* モデル）の利用の可能性を考慮する必要がある。」このように、本ガイドラインでは免疫原性の予測は要求事項とはなっていない。一方、上記の新たな技術については、今後更に改善されることが期待され、将来有用となる可能性も指摘されている。なお、*in silico* モデルとは、後述するように、コンピューターを用いるバイオインフォマティクスを利用する免疫原性の予測法である。

現在使用できる免疫原性の予測方法は、主にT細胞の免疫反応に基づいて設定されたものに限定されている。そこで、本総説では主にT細胞の免疫反応に基づいた、免疫原性の予測方法の現状と問題点について概説する。なお本稿は成書を参照した<sup>16, 19-25)</sup>。しかし、治療用タンパク質の投与による抗体産生の効率的な誘導は、T細胞の活性化と密接に関連することが多い。

## 1. 抗体産生の機構

免疫原性の予測方法について述べる前に、抗体産生の機構を理解することは、その予測方法の妥当性を理解するうえで重要と考えられる。以下にT細胞依存的及び非依存的な抗体産生の機構について述べる。

### 1.1 T細胞依存的な抗体産生の機構

T細胞依存的な抗体産生の最初のステップは、樹状細胞のような抗原提示細胞による抗原の取り込みである。なお本稿では特に記載しない限り、T細胞とはヘルパーT細胞を指す。抗原提示細胞は抗原をペプチドに限定分解し、抗原提示細胞表面の主要組織適合抗原複合体 (major histocompatibility complex, MHC) クラスII分子を介して未感作T細胞上のT細胞受容体に提示する。抗原提示細胞から、CD80及びCD86のような共刺激分子からのシグナルが、T細胞に伝達され、T細胞が活性化される。活性化されたT細胞は増殖し、多くの種類の

サイトカインを多量に産生する。一方、未感作B細胞の活性化は、B細胞表面受容体と抗原との相互作用により開始される。T細胞受容体が、B細胞表面のT細胞エプिटープ/MHCクラスII分子を認識すると、T細胞とB細胞の間の相互作用が開始され、T細胞はB細胞にサイトカインを供給し、B細胞の増殖を刺激する。T細胞からのCD40リガンドとB細胞のCD40との相互作用により、B細胞に更にシグナルが伝わる。その結果、B細胞は増殖すると共に、抗体分泌プラズマ細胞及びメモリーB細胞へ分化する。分化したメモリーB細胞は抗原の再暴露に伴い速やかに抗体を産生する。

### 1.2 T細胞非依存的な抗体産生の機構

抗体産生は、T細胞による刺激が無い状態でも、直接的なB細胞の活性化により速やかに起こることがある。例えば、T細胞非依存的な抗体産生は、微粒子状の抗原及び微生物及びウイルス由来の配列と受容体との結合により、引き起こされる。治療用タンパク質の場合は、凝集体を形成するかあるいは病原体と似た構造を取ることにより、B細胞に対する免疫原性が大きく増加する<sup>26, 27)</sup>。また、血液の末梢樹状細胞 (CD11c<sup>+</sup> Mac1<sup>+</sup>) が、微粒子状の抗原を取り込み、脾臓へ移動することにより、B細胞の活性化及び増殖が促進される。治療用タンパク質の凝集体も同様である<sup>27)</sup>。免疫系は、タンパク質、多糖類、核酸あるいは脂質の繰り返し構造を認識するように発達しており<sup>28)</sup>、バクテリアとウイルス由来の多価抗原で、T細胞非依存的な免疫応答が示されている<sup>28-30)</sup>。未感作B細胞は、凝集タンパク質のエプिटープを認識して結合する。B細胞表面の複数の受容体が、同時に抗原と結合することにより架橋が形成され、B細胞が活性化される<sup>31)</sup>。直接的なB細胞刺激により産生される抗体は、主にIgMと低親和性のIgGアイソタイプである。IgMは複数の結合部位を有するため、抗体の個々の結合部位と抗原との相互作用を合わせた親和性 (avidity) が強い。しかし、高親和性抗体の産生及びIgMからIgGへのアイソタイプの転換には、T細胞あるいは例えばToll-like receptorのような他の経路を介した2番目のシグナルが必要である<sup>28-31)</sup>。

## 2. タンパク質治療薬の免疫原性の予測

先に示したT細胞依存的な抗体産生の機構に基づいて、ヒトのMHCクラスII分子であるHLR-DR, HLA-DP, HLA-DQ等 (以下、HLAクラスII分子) とエプिटープとの結合予測、及び*in vitro*のT細胞の免疫反応の測定により、T細胞依存的なタンパク質治療薬の免疫原性

の予測が試みられている。同様に、T細胞非依存的な抗体産生の機構に基づき、B細胞受容体と治療用タンパク質との結合予測により、T細胞非依存的なタンパク質性治療薬の免疫原性の予測が試みられている。以下にタンパク質治療薬の免疫原性を予測するための様々な方法について述べる。

## 2.1 T細胞エピトープの *in silico* 予測方法

T細胞エピトープの *in silico* 予測方法とは、HLAクラスII分子に結合するエピトープに関する様々な情報に基づき、特定のタンパク質においてHLAクラスII分子に結合するエピトープを予測する方法である。これにはバイオインフォマティクスを用いた様々な予測方法があり、タンパク質配列内に含まれるT細胞エピトープについて、迅速な予測が可能である<sup>22)</sup>。RankPep<sup>32, 33)</sup>、Proped<sup>34)</sup>、Tepitope<sup>35)</sup>、NetMHCII<sup>36)</sup>、EpiMatrix<sup>37, 38)</sup>は、広範囲のHLAクラスII分子に対するT細胞エピトープの予測方法の例である。なお、EpiMatrixを除き、本稿で紹介した方法及びその他の方法<sup>39)</sup>は、公開されており無償で使用できる<sup>19, 23)</sup>。

これらの予測方法は、基となるデータベース、予測の理論的根拠の構築及びそれに伴う評価法がそれぞれ異なる。その詳細については、上記の成書を参考にされたい。なお、予測可能なHLAクラスII分子の数は、RankPepで50種類、Propedで51種類、Tepitopeで25種類、NetMHCIIで14種類、EpiMatrixで74種類である。

### 2.1.1 *In silico* T細胞エピトープ予測とT細胞アッセイによる予測の比較

以下に、*in silico* T細胞エピトープ予測の結果と、後で詳述するT細胞アッセイを用いた予測結果の比較を示す。

エリスロポエチン、ヒルジン、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ について、Proped法、RankPep法、Tepitope法を用いて予測されたHLAクラスII分子のエピトープと、T細胞アッセイの結果との比較がなされた<sup>23)</sup>。この解析から、これら*in silico*法はT細胞エピトープを含む領域を部分的にしか予測できないことが明らかになった。例えば、ヒルジンの場合、T細胞アッセイで同定されたT細胞エピトープの領域は、上記三つの*in silico*法の内二つで予測できなかった。また、全ての*in silico*法は、多くの場合、T細胞のエピトープを5割以上多目に予測した。更に、*in silico*法において免疫原性を有すると同定されたペプチドの領域は、多くの場合長目の配列として示される。したがって、実際にエピトープとなる領域の改変あるいは除去が必要となる場合、エピトープの数及び領域を詳細に特定することが困難である。これはIFN- $\beta$

配列で特に顕著であり、*in silico*法で多くのペプチドがエピトープとなることが予測されたが、T細胞アッセイで同定されたT細胞エピトープの領域とは二つしか重ならなかった。しかし、T細胞アッセイと*in silico*法を用いた解析で一致した例もある。例えば、エリスロポエチンにおいてT細胞アッセイで同定された2個のT細胞エピトープは、全ての*in silico*法で推定された領域と重なった。また、IFN- $\alpha$ では、T細胞アッセイで同定された三つのエピトープは、*in silico*法で予測された三つの長い配列と重なった。

Tepitopeを用いた解析結果について述べる。本法によりカルシトニン、エリスロポエチン、インスリン、IFN- $\beta$ について、予測された15merの部分重複する105個のペプチドのうち15個のHLAクラスII分子に対する結合が調べられた<sup>40)</sup>。その結果、88%のペプチドがHLAクラスII分子に結合することが予測された。エリスロポエチンの36個のペプチドについては、T細胞アッセイでわずか5個のペプチドしか同定されなかった。本法により、ヒトテロメラーゼについて、15merあるいはそれ以上の長さの10個のペプチドが、複数のHLA-DR分子に結合することが予測された<sup>41)</sup>。そして、その全てが、複数のHLA-DR対立遺伝子由来のT細胞を用いたアッセイで反応することが示された<sup>41)</sup>。しかし、これらの細胞から調製したCD4<sup>+</sup>T細胞クローンのうち、抗原提示細胞により実際にプロセッシングを受けたペプチドと反応するものはわずか1種類であった<sup>41)</sup>。本法により prostate-specific membrane antigenについて、6個のエピトープが8種類のHLA-DRに対して結合することが予測された<sup>42)</sup>。そして、その全てが複数のHLA-DR対立遺伝子由来のT細胞を用いたアッセイで反応することが示された<sup>42)</sup>。しかし、これらの細胞から調製したCD4<sup>+</sup>T細胞クローンのうち、抗原提示細胞により限定分解を受けたペプチドと反応するものはわずか1種類であった<sup>42)</sup>。

EpiMatrixを用いた解析結果については、抗体産生を誘導することが明らかになっている21種類のヒト及びキメラ抗体医薬品について、本法による免疫原性の予測結果との比較がなされた<sup>16)</sup>。本法により免疫原性が予測できなかったモノクローナル抗体はわずか2個であった。健康人に単回投与すると37%で抗体が産生される、Angiopoietin-2とその受容体であるTie-2の結合に対し、阻害活性を有する24merのペプチドをFcフラグメントに2個連結し、癌に対する抗血管新生治療薬として開発された組換えタンパク質について、HLAクラスII分子に対するエピトープが、本法により調べられた<sup>43)</sup>。その結果、C末端14個のアミノ酸に強い免疫原性が予測

され、抗体陽性群において、このペプチドに対するメモリー T 細胞が観察された。また、抗体陽性の患者から予測されたエピトープに結合する HLA クラス II 分子は、ハプロタイプ（同一染色体上の一対の対立遺伝子又は領域の組み合わせ）DRB\*0701/1501 と同定され、その型は本法により予測された結果と一致した。組換えヒト glial-derived neurotrophic factor は、パーキンソン病の治療薬として開発されたが、患者に投与すると、34 人のうち 8 人で抗体が検出されている。そこで、この組換えヒト glial-derived neurotrophic factor の HLA クラス II 分子に対するエピトープが調べられた<sup>44)</sup>。その結果、HLA クラス II 分子に対する二つのエピトープが予測され、これらのエピトープが抗体産生の誘導に関与していることが示唆された。

### 2.1.2 *In silico* T 細胞エピトープ予測方法の問題点

*In silico* 予測において、HLA クラス II 分子の結合ポケットへのペプチドの結合の特異性は、ペプチドのアミノ酸側鎖に依存している。したがって、その結合特異性は、非常に複雑である。HLA クラス II 分子には非常に多くの型が存在する。したがって、個人によって、各ペプチドが結合する HLA クラス II 分子は、大きく異なっていることが予想される。そのため、HLA クラス II 分子に結合するペプチドの予測には、非常に多数の異なる型の HLA クラス II 分子を用いる必要がある。予測に用いる HLA クラス II 分子の数は増加しているが、今後とも更に増やす必要がある。

更に、*in silico* 予測で、HLA クラス II 分子に結合することが予測されたペプチドの多くは、抗原提示細胞によるタンパク質の限定分解により生成されず、生成されて HLA クラス II 分子と複合体を形成しても、T 細胞受容体に認識されないものもある。その理由は、HLA クラス II 分子結合ポケットから離れて存在するペプチド領域は、T 細胞受容体により認識されうるが、HLA クラス II 分子に対する結合にはほとんど影響を与えないからである<sup>45-51)</sup>。このように、*in silico* 予測で、HLA クラス II 分子と複合体を形成することが予測されるペプチドは、T 細胞受容体との結合に適している領域に関する情報を提供しない。なお、HLA クラス II 分子と結合するペプチドの中で、T 細胞への提示に重要な役割を果たしている領域については、タンパク質の構造と、そのペプチドの側面に位置する配列依存的なプロテアーゼの開裂部位に関する情報により提供される<sup>52)</sup>。

以上述べたように、*in silico* 法で予測された HLA クラス II 分子に結合するペプチドの中には、多くの偽陽性が含まれる。したがって、本法は一次スクリーニングとしてはある程度有用な場合もあるが、その結果は、例え

ば T 細胞を用いた *in vitro* のアッセイで確認する必要がある。

一方、本法では、免疫原性に関与する宿主由来不純物（宿主由来タンパク質、エンドトキシン等）及び治療用タンパク質の凝集体の免疫原性は予測できない。

### 2.2 B 細胞エピトープの *in silico* 予測方法

B 細胞エピトープ予測方法は、T 細胞エピトープ予測方法よりも開発が著しく遅れている。その原因の一つは、T 細胞では、抗原提示細胞によりタンパク質が限定分解を受け、MHC クラス II 分子と結合した直線状ペプチドのエピトープが認識されるのに対し、B 細胞の場合は、限定分解を受けていないタンパク質全体の特定の二次構造又は立体構造を B 細胞受容体（表面イムノグロブリン）が認識することがあるからである<sup>53,54)</sup>。実際、*in silico* 法で、B 細胞に認識される三次元の立体構造を取るエピトープは明らかにされておらず、その予測法の開発は進んでいない。最近、抗原の構造情報に基づいて立体構造のエピトープを予測する方法として、DiscoTope<sup>55)</sup>、CEP<sup>56)</sup>が開発されている。しかし、これらは、様々なタンパク質の B 細胞エピトープを十分に予測するには不完全であり、今後更に改良する必要性が指摘されている<sup>57-59)</sup>。

### 2.3 HLA 結合アッセイ

HLA 結合アッセイは、治療用タンパク質から由来するペプチドの HLA クラス II 分子に対する結合の評価に用いることができる。このアッセイでは、多数の HLA クラス II 分子に対するエピトープ配列の結合の親和性を測定できる。HLA クラス II 分子に対するペプチドの結合は、例えば、その蛍光標識リガンドとペプチドの HLA クラス II 分子に対する結合の競合により測定を行い、多くの測定を迅速に行うことも可能である<sup>60,61)</sup>。用いるペプチドの長さは 9 から 25 mer である。ヘルパー T 細胞の HLA クラス II 分子に対するエピトープは、ペプチドの長さがそれほど制限されず、結合に関与しない余分の領域が両末端に存在しても、両者の結合は起きる。このようなエピトープの HLA クラス II 分子に対する結合には、直線状の形態を維持できるペプチドの長さが必要であり、20 mer 以上では、場合によっては溶液中での二次構造の形成により結合できない場合がある。通常、本法では精製した HLA クラス II 分子を用いるが、その代わりに様々な HLA クラス II 遺伝子のホモ接合性のリンパ芽球様細胞株を用いても実施できる<sup>62,63)</sup>。

精製した HLA クラス II 分子を用いてタンパク質のエピトープを予測した例は、HLA-DRB1\*に対する high

active hepatocyte binding peptides のエピトープ<sup>64)</sup>がある。なお、HLA クラス I 分子については、プロインスリンのエピトープ<sup>65)</sup>、HLA-A3 に対する human immunodeficiency virus-1 タンパク質のエピトープ<sup>66)</sup>、HLA-A\*0201 に対する tyrosinase-related protein-2<sup>67)</sup> 等が報告されている。

一方、HLA ホモ接合性のリンパ芽球様細胞株を用いた例は、第Ⅷ因子で 402-416 のアミノ酸配列の領域が HLA クラス II の DRB1\*0101 に結合する例<sup>63)</sup>、BCR-ABL 融合領域で 17 個のペプチドが HLA クラス I の HLA-A68, HLA-B51, HLA-B61, HLA-Cw4 に結合する例<sup>62)</sup> が報告されている。なお、BCR-ABL とは、本来 9 番染色体上にある *ABL* 遺伝子と 22 番染色体上にある *BCR* 遺伝子が、何らかの原因により染色体が相互転座した際に融合してできたキメラ遺伝子から、転写及び翻訳されたタンパク質である。

本法の欠点は、試験できる HLA クラス II 分子の多型の数が限られていることである。これらのアッセイでは、精製した HLA クラス II 分子を用いる必要があるが、その精製は容易ではなく、大量のホモ接合性のリンパ芽球様細胞株、あるいは対象とする HLA クラス II 分子を発現するトランスジェニック遺伝子導入細胞株を培養する必要がある。したがって、多数の HLA クラス II 分子に対するペプチドの結合を解析することは容易ではない。その代わりに、固定したホモ接合性のリンパ芽球様細胞株を用いる場合は、ペプチドを細胞に直接インキュベーションする。したがって、HLA クラス II 分子を精製する必要がなく、多くのペプチドを迅速に解析することが可能である。しかし、比較的大量の細胞培養が必要であり、多数の HLA クラス II 分子との結合の解析は容易ではない。また、これらの方法では、*in silico* 法により抗原提示細胞による抗原の限定分解が予測され、それに基づいて作成されたペプチドが試験される。しかし、これらのペプチドが抗原提示細胞により実際に生成されるかどうかは不明である。したがって、HLA クラス II 分子と結合するペプチドを過剰に予測してしまうことも欠点である。また、同様な理由により、本法で特定のペプチドが HLA クラス II 分子と結合することが示されても、T 細胞受容体に認識されない場合もある。

## 2.4 T 細胞を用いたアッセイ

T 細胞反応の検出は、通常、ヒト由来の抗原提示細胞と T 細胞存在下において、治療用タンパク質あるいはそのペプチドを添加し、T 細胞の反応を測定することにより行う。この方法では、HLA クラス II 分子に対するペプチドの親和性よりも、例えば増殖反応及びサイトカイン

の遊離のような、エピトープにより引き起こされる実際の反応が示される。したがって、*in vivo* の結果をより正確に反映できる。

### 2.4.1 T 細胞を用いたアッセイの特徴

T 細胞としては、通常、ボランティアあるいは患者からの peripheral blood mononuclear cell (PBMC) を用いる。通常、解析には標的となる人口集団の代表を示すために、最低 50 人のドナーからの PBMC を用いる。PBMC は新鮮な全血サンプルから分離し、抗原あるいは特定のサイトカインを添加し、特異的な T 細胞を増殖させる。1 週間のインキュベーション後、PBMC に抗原及び抗原提示細胞として自己単球を添加する。これにより、最初に反応したヘルパー T 細胞に 2 回目の刺激が与えられる。通常、治療用タンパク質で 2 回の刺激を行う。一方、治療用タンパク質で最初に刺激し、治療用タンパク質由来するペプチドで 2 回目に刺激を行うと、特異的なエピトープの同定が可能である。なお、検出された反応が T 細胞に由来することを確認するために、PBMC から CD8<sup>+</sup> 細胞のような反応性のある他の細胞を予め除去する必要がある。なお、この除去は、細胞の特異的な細胞表面マーカーを選択できるフローサイトメーターを用いたアッセイでは必要ない。

T 細胞反応を検出する一つ目の方法は、刺激により遊離される IFN- $\gamma$ 、interleukin (IL)-2、IL-4 のようなサイトカインを、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)、あるいは enzyme-linked immunospot assay (ELISpot) により測定することである。ELISpot は ELISA と多くの点で類似しているが、特定のサイトカインを分泌する細胞数を測定する点が異なる。以下にその測定原理を示す。サイトカインに特異的な抗体でコートしたプレート上で細胞を培養後除去し、分泌されプレートに結合したサイトカインを ELISA により測定する。最終的に、産生細胞が位置していた場所で、添加した基質の発色によるスポットが形成されるため、プレートにおいて発色した基質の濃度を定量する代わりに、分泌細胞の数とその全細胞に占める割合が測定される。ELISpot の検出感度は、ELISA に比べ 20~200 倍高い。

T 細胞反応を検出する二つ目の方法は、増殖を用いた測定である。細胞に取り込ませた蛍光色素の娘細胞への分配、増殖細胞の DNA への <sup>3</sup>H 標識チミジンあるいは 5-ブromo-2'-デオキシウリジンへの取り込みにより測定できる。どの方法を用いる場合でも、個人間で治療用タンパク質の非存在下における増殖反応が非常に変動する。したがって、治療用タンパク質に対する T 細胞増殖反応は、治療用タンパク質の非存在下における増殖反応と比較する必要がある<sup>68)</sup>。



蛍光標識及び細胞内サイトカイン染色も、T細胞反応を測定する精度の高い方法である<sup>69,70)</sup>。例えば、特定のエピトープに反応するT細胞は、ビオチン化したHLAクラスI分子の $\alpha$ 鎖、 $\beta_2$ -ミクログロブリン、ペプチド抗原をアビジンにより四量体化した複合体（テトラマー）を用いて直接標識でき、標識された細胞はその後フローサイトメーターによりカウントできる。

#### 2.4.2 T細胞を用いたT細胞エピトープの同定の例

ヒト末梢血CD4<sup>+</sup>T細胞の増殖を指標としたアッセイにおいて、T細胞のエピトープが調べられた。その結果、HLA-DR2とそれに連続した一連の遺伝子であるHLA-DQ6とHLA-DR15のハプロタイプにおいて、ヒトIFN- $\beta$ のエピトープ（118~132番目のアミノ酸配列）が同定された<sup>71)</sup>。

ヒトIFN- $\beta$ ペプチド（118-132）に対して、強いCD4<sup>+</sup>T細胞増殖能を示すBALB/cByJマウスを、IFN- $\beta$ で免疫後、分離した脾臓を培養し、アラニン変異により作成した118~132番目のペプチドによる増殖能が調べられた<sup>72)</sup>。その結果、129番目のイソロイシンをアラニンに置換したペプチドで増殖能の低下が示された。

添加剤としてのヒト血清アルブミンを除いたIFN- $\beta$ 1a（Rebif）であるRNF1及びRNF2と、ヒト血清アルブミンを含む従来のIFN- $\beta$ 1aで、T細胞反応が比較された<sup>73)</sup>。なお、RNF1及びRNF2は10 mM sodium acetateを緩衝液として用い、安定化剤としてRNF1はpoloxamer 188, lysine, RNF2はD-mannitol, benzyl alcohol, L-methionine, poloxamerを用いている。RNF1及びRNF2は、ヒト血清アルブミンを含むIFN- $\beta$ 1aと比べて、ELISpotにより測定されたIL-2の遊離が、それぞれ25%及び38%低下した。同様に、増殖を比較すると、37%及び50%低下した。これらのRebifで予測された抗体産生の誘導の低下は、その後の第三相臨床試験の結果により確認された<sup>74,75)</sup>。

重篤な血友病の患者で第VIII因子に対する高い抗体価を示す患者と健康な男性から得られた、B細胞を除去したPBMCに、組換えヒト第VIII因子を加えて培養し、<sup>3</sup>H標識チミジンの取り込みが測定された<sup>76)</sup>。その結果、抗体陽性患者の3分の1で約8倍から20倍まで取り込みが増加した。更に細胞を分画することにより、組換えヒト第VIII因子に反応する細胞が、T細胞であることが確認された。

重篤な血友病の患者で高い抗体価を有する患者から分離されたT細胞の細胞株の増殖が、Bドメインの全体を欠損した組換えブタ第VIII因子の領域の中で、8個のアミノ酸配列が重複した15残基の合計60個ペプチドのプールに対して調べられた<sup>63)</sup>。また、その中で、陽性のペプ

チド及びその変異ペプチドのHLAクラスII分子に対する結合能、及びT細胞の増殖能が、健康人ドナーで評価された。なお、本組換え第VIII因子はBドメインを含む血漿由来ブタ第VIII因子と同様な凝固及び生物活性を有し、毒性、病原体の感染リスク及び製造のしやすさの観点において、Bドメインを含む血漿由来ブタ第VIII因子より優る可能性があることから開発されている。その結果、そのペプチドのプールの中で2098~2112番目の配列に相当するペプチドが、血友病患者及び健康ドナー各一人で強いT細胞増殖促進を引き起こし、多くの種類のHLAクラスII分子に結合した。また、この領域を欠失させた第VIII因子は活性を維持し、T細胞増殖促進反応を引き起こさず、HLAクラスII分子に結合しなかった。

健康人からのPBMCを各種のエリスロポエチンペプチドで処理し、IFN- $\gamma$ の産生がELISpotで測定された<sup>40)</sup>。その結果、91~120, 126~155番目の配列に相当するペプチドで、IFN- $\gamma$ の産生が誘導された。また、その誘導は様々なHLAクラスIIを有するPBMCで起きた。これらの領域を置換したエリスロポエチンのうち、2種類は生物活性を有し、IFN- $\gamma$ の産生を誘導しなかった。

## 2.5 免疫原性の *in vivo* における予測

タンパク質治療薬の免疫原性の非臨床試験は、従来より非ヒト霊長類で、ごく最近では特異的なマウスモデルでも行われている。*In vivo*の研究により、T細胞反応及び抗体の産生誘導を含む広範囲のデータが、特定のタンパク質治療薬で得られている。*In vivo*の試験が、ヒトにおける免疫原性の予測方法として適しているか否かは、臨床データとの関連で評価される。また、動物モデルでは、タンパク質治療薬の剤型、投薬法（投与量、投与頻度、投与部位）、凝集体、分解物等、他の方法では予測できない免疫原性に関する因子についても、理論的には予測が可能である。後述するように、多くのモデルの予測能には限界があるが<sup>77)</sup>、*in vivo*の試験要素を組み込むことが可能であれば望ましい。現時点では、ヒト型タンパク質治療薬の免疫原性予測に理想的な動物モデルはないが、非ヒト霊長類モデル、特定の治療用タンパク質及びHLAのトランスジェニックマウス等が有用な場合もある。

### 2.5.1 非ヒト霊長類及びその他の動物モデル

テナガザル、チンパンジー、オランウータン、ゴリラのような類人猿は、系統発生的にヒトと近いが、ヒトと身体の大きさが異なること、価格が高いこと、倫理的問題等から、非臨床における使用には問題点が多い。カニクイザルあるいはアカゲザルのような旧世界のサルは、類人猿よりも系統発生的にヒトからより離れているが、

実用的な理由により、特にワクチンの研究において、安全性及び免疫原性の評価に一般的に使用されている<sup>78)</sup>。

得られたデータの評価において考慮すべきことは、ヒトと非ヒト霊長類の間には重要な違いがあるということである。例えば、ヒトと非ヒト霊長類の間には、種間の相違により MHC クラス II 分子の配列に顕著な差がある。そのため末梢免疫系に対して提示される T 細胞のエピトープ<sup>79)</sup>。更に、重篤なサイトカインストームがヒトのボランティアで起きた TeGenero 臨床試験の結果は、非ヒト霊長類の非臨床モデルで検出されなかった免疫系を介した有害事象が、ヒトでは起こったことを示している<sup>80)</sup>。他の抗体である Campath-1H でも、リウマチ性関節炎の患者でみられた有害事象が、非ヒト霊長類を用いた試験で予測できなかった<sup>81)</sup>。これらの例は、非ヒト霊長類を用いた免疫原性の予測結果が、臨床試験における免疫原性を予測できない場合もある可能性を示したものである。反対にヒト化抗 tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  抗体<sup>82)</sup>、IFN- $\gamma$ <sup>83, 84)</sup>、ヒト可溶性 CD4<sup>85)</sup> の場合のように、非ヒト霊長類モデルが治療用タンパク質の免疫原性を過大評価する場合もある。

### 2.5.2 HLA トランスジェニックマウス

HLA トランスジェニックマウスでは、限定分解を受けたペプチドが HLA 分子により提示されるため、野生型のマウスよりは、T 細胞エピトープの予測において優れたモデルである。治療用タンパク質の予測ではないが、自己免疫疾患の原因分子のエピトープに結合する HLA 分子を発現するトランスジェニックマウスが開発されている。また、それらのマウスで、患者で同定されたエピトープと同一な主要エピトープとして同定されている<sup>86~94)</sup>。今後、治療用タンパク質の免疫原性を予測する場合の参考として、それらの例のいくつかについて以下に示す。

関節リウマチの発症因子である human cartilage glycoprotein-39 (HCgp-39) に反応する CD4<sup>+</sup>T 細胞の分析が行われた<sup>91)</sup>。HLA-DR4 (DR $\alpha$ 1\*0401)/ヒト CD4 を導入した MHC 欠損マウスを HCgp-39 で免疫し、HCgp-39 特異的な T 細胞のハイブリドーマが作成された。この T 細胞ハイブリドーマを用い、IFN- $\gamma$  及び TNF- $\alpha$  の産生促進を指標として、HCgp-39 のエピトープが同定され、そのエピトープは同じ HLA-DR4 陽性の患者から得られた T 細胞の反応を促進した。

多発性硬化症の発症因子である myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) に反応する CD4<sup>+</sup> 細胞の分析が行われた<sup>88)</sup>。様々な型の HLA トランスジェニック/MHC クラス II 欠損マウスを、MOG で免疫後、分離したリンパ球を用いて、T 細胞の増殖及びサイトカインの産生により、MOG のエピトープが同定された。なお、サイトカ

インの産生は ELISA 及び ELISpot が用いられた。また、免疫したトランスジェニックマウスからの抗 MOG 抗体に反応する MOG のペプチドも同定された。このような T 細胞及び B 細胞のエピトープは複数同定され、そのほとんどが多発性硬化症患者で報告されているエピトープと一致した。

インスリン抵抗性糖尿病の発症因子の 1 つである glutamic acid decarboxylase isoform 2 (GAD65) に反応する CD4<sup>+</sup> 細胞の分析が行われた<sup>94)</sup>。HLA-DR ( $\alpha$ \*0101,  $\beta$ \*0401)、ヒト CD4 が導入されたマウス MHC クラス II 欠損マウスを GAD65 で免疫し、T 細胞ハイブリドーマが作成され、ELISA による IL-2 の産生を指標に GAD65 のエピトープが複数同定された。同定されたエピトープの半分はインスリン抵抗性糖尿病患者で報告されているエピトープと一致した。

参考までに述べると、HLA トランスジェニックマウスは、以下のようにワクチンの開発で、特定の MHC クラス I に結合するエピトープの同定にも用いられている。

HLA-A2.1 トランスジェニックマウスが、組換え C 型肝炎ウイルスワクチンにおいて有効なペプチドの同定に用いられた<sup>95)</sup>。HLA-A2.1 トランスジェニックマウスを、組換え C 型肝炎ウイルスワクチンで免疫し、脾臓細胞が分離された。C 型肝炎ウイルスの各種ペプチドで脾臓細胞を刺激し、Jurkat-A2/K<sup>b</sup> 細胞の細胞溶解反応より、傷害性 T 細胞反応に関与するエピトープが同定された。HLA-A2 陽性の C 型肝炎の患者から調製した末梢血を、そのエピトープで刺激すると、同様に細胞傷害性 T 細胞の反応が引き起こされた。

HLA-A2.1 トランスジェニックマウスは、組換え A 型インフルエンザワクチンに有効なペプチドの同定にも用いられた<sup>39)</sup>。HLA-A2.1 トランスジェニックマウスを組換え A 型インフルエンザワクチンで免疫し、脾臓細胞が分離された。脾臓細胞をインフルエンザ A ウイルスの各種ペプチドで刺激し、Jurkat-A2/K<sup>b</sup> 細胞の細胞溶解反応より細胞傷害性 T 細胞の反応に関与するエピトープが同定された。HLA-A2 陽性の A 型インフルエンザウイルスに感染した患者から調製した末梢血を、そのエピトープで刺激すると、同様に細胞傷害性 T 細胞の反応が引き起こされた。

HLA トランスジェニックマウスによる治療用タンパク質の免疫原性に関与するエピトープの予測は、患者の HLA 型が既知の場合、及び *in silico* 法等によりエピトープと結合する HLA 型が予測されている場合に限って有効である。しかし、そうでない場合は、用いた HLA 型によりエピトープが検出されない可能性が高い。

### 2.5.3 ヒト治療用タンパク質のトランスジェニックマウス

ヒト治療用タンパク質の免疫原性の評価のモデルとして、ヒト治療用タンパク質を発現することにより、それに免疫寛容になったトランスジェニックマウスも開発されている。ヒトインスリンのトランスジェニックマウスで、ヒトインスリンのウシインスリンに相当するアミノ酸への置換が、抗体産生反応に及ぼす影響について調べられた<sup>96)</sup>。その結果、A鎖の8あるいは10位のアミノ酸をウシインスリンに相当するアミノ酸に置換したインスリンを投与すると、抗体が産生された。ヒト IFN- $\alpha$ 2b トランスジェニックマウスにヒト IFN- $\alpha$ 2a を投与しても、抗体は産生されなかった<sup>97)</sup>。ヒト tissue plasminogen activator (tPA) トランスジェニックマウスに1アミノ酸だけ置換したヒト tPA を投与すると、抗体が産生された<sup>98)</sup>。ヒト IFN- $\alpha$ 2b において、金属による酸化、温度上昇あるいは異なる pH での処理により作成した凝集体と正常な型の比を変えて、ヒト IFN- $\alpha$ 2b トランスジェニックマウスに投与すると抗体が産生され、その程度は、凝集体のレベル及び作成法により異なった<sup>99)</sup>。ヒト IFN- $\beta$ 1b トランスジェニックマウスに大腸菌由来のヒト IFN- $\beta$ 1b を投与すると、抗体が産生した<sup>100)</sup>。

このようなトランスジェニックマウスは、治療用タンパク質の立体構造の変化が免疫原性に及ぼす影響について解析する場合に特に有効であるが、特定の治療用タンパク質毎にトランスジェニックマウスを作成する必要がある。

#### 2.5.4 ヒト CD34<sup>+</sup> 幹細胞移植マウスモデル

重症複合免疫不全 (SCID) マウスにヒト免疫系を移植することにより、治療用タンパク質の免疫原性をより正確に予測できるかもしれない。

内在性 B 細胞, T 細胞, CD34<sup>+</sup> 細胞を欠損する RAG2 及び  $\gamma_c$  欠損マウス新生児に、臍帯血由来のヒト CD34<sup>+</sup> 幹細胞を移植する試みがなされている。なお本マウスは、以下の二つの系統のマウスの遺伝交雑により作成された。1つは common cytokine receptor  $\gamma$  chain ( $\gamma_c$ ) を欠損しており、末梢 T 細胞, B 細胞の数が低下し、ナチュラルキラー細胞活性を欠損している。もう1つは recombinase activating gene 2 (RAG-2) を欠損している。上記移植マウスはヒトの T 細胞, B 細胞, 樹状細胞から構成され、十分な機能を有するヒト免疫系が形成された<sup>101)</sup>。また、このマウスは破傷風毒素及び Epstein-Barr ウイルスに対して、抗体の産生, メモリー B 細胞の出現, B 細胞の増殖等の免疫反応を示した。同様にヒト IL-3 の存在下 RAG 及び  $\gamma_c$  欠損マウスにおいて、様々なサイトカインの組み合わせで培養したヒト臍帯血 CD34<sup>+</sup> 細

胞が移植された<sup>102)</sup>。免疫系をヒト化したマウスにおいて、レベルは低いが、ヒトの T 細胞, B 細胞, NK 細胞, 樹状細胞が発達し、一次及び二次リンパ器官が形成された。ヒトリンパ球の増殖及び機能が、ヒトヘマグルチニン及びヒト IL-2 で刺激した脾臓及び骨髓細胞を用いて検討された。その結果、ヒト IL-3 の存在下で、CD3<sup>+</sup>T 細胞及び CD56<sup>+</sup>NK 細胞の増殖、NK 細胞からの IFN- $\gamma$  の遊離の増加がみられた。

成熟したリンパ球及び NK 細胞を欠損した NOD-SCID IL-2 $\gamma$  欠損マウスに、造血幹細胞を移植する試みがなされている。ヒト造血幹細胞をこのマウスに移植すると、ヒトの B 細胞, NK 細胞, 骨髓細胞, 樹状細胞, CD3<sup>+</sup>T 細胞がみられた<sup>103)</sup>。脾臓から分離した白血球を、ヒトヘマグルチニン, 連鎖球菌のスーパー抗原及びエンドトキシンで刺激すると、増殖が促進された。同マウスに、CD34<sup>+</sup> 細胞を含む臍帯血由来の培養細胞が移植された<sup>104)</sup>。移植する前に TNF- $\alpha$  を投与すると、ヒト胸腺細胞及び T 細胞の発達がみられ、T 細胞は抗 CD3 抗体により増殖した。このマウスは T 細胞依存的及び非依存的に抗体を産生した。

しかし、これらのマウスで開発された免疫系には、必要な量及び型の全てのヒト細胞及び液性因子が存在するわけではない。更に、これらのマウスではヒト免疫系成分が生殖細胞系に伝達されない。したがって、個々の試験で新たに同様なマウスを作成する必要がある。

#### 2.5.5 免疫原性の予測に適した理想的な動物モデル

抗原提示細胞による抗原の取り込み及び HLA クラス II を介した提示という、T 細胞エピトープ同定の理想的な動物モデルとは、タンパク質分解の限定分解及び提示の経路を含む異なる HLA 対立遺伝子を導入した多種類のトランスジェニックマウスである。更に、ヒト T 細胞受容体等による認識系を含め、最終的には、B 細胞レベルでの高親和性ヒト抗体の反応が起こるように改変する必要がある。このような動物モデルの作成は技術的に極めて困難であるが、将来の非臨床開発において免疫原性を最も正確に予測できるモデルになるとと思われる。

### おわりに

タンパク質治療薬を開発する場合、予想及び観察される免疫原性に関するリスク評価法の開発に強い注目が置かれている。この点に関して、本稿で示した T 細胞エピトープの *in silico* 予測方法、HLA 結合アッセイ、T 細胞を用いた *in vitro* のアッセイは、免疫原性に関するタンパク質治療薬の T 細胞エピトープの予測に今後有用となるかもしれない。一方、これらの方法は前述し

- Cytokine Res.*, **16**(7), 519-22 (1996).
- 85) Truneh, A., Frescatore, R. L., Thiem, P., Leary, J. J., Rosenberg, M., Hanna, N., Sweet, R. and Bugelski, P. J.: *Cell Immunol.*, **131**(1), 98-108 (1990).
- 86) Rojas, J. M., McArdle, S. E., Horton, R. B., Bell, M., Mian, S., Li, G., Ali, S. A. and Rees, R. C.: *Cancer Immunol. Immunother.*, **54**(3), 243-53 (2005).
- 87) Kelemen, K., Gottlieb, P. A., Putnam, A. L., Davidson, H. W., Wegmann, D. R. and Hutton, J. C.: *J. Immunol.*, **172**(6), 3955-62 (2004).
- 88) Khare, M., Rodriguez, M. and David, C. S.: *Int. Immunol.*, **15**(4), 535-46 (2003).
- 89) Black, K. E., Murray, J. A. and David, C. S.: *J. Immunol.*, **169**(10), 5595-600 (2002).
- 90) Kawamura, K., Yamamura, T., Yokoyama, K., Chui, D. H., Fukui, Y., Sasazuki, T., Inoko, H., David, C. S. and Tabira, T.: *J. Clin. Invest.*, **105**(7), 977-84 (2000).
- 91) Cope, A. P., Patel, S. D., Hall, F., Congia, M., Hubers, H. A., Verheijden, G. F., Boots, A. M., Menon, R., Trucco, M., Rijnders, A. W. and Sonderstrup, G.: *Arthritis Rheum.*, **42**(7), 1497-507 (1999).
- 92) Herman, A. E., Tisch, R. M., Patel, S. D., Parry, S. L., Olson, J., Noble, J. A., Cope, A. P., Cox, B., Congia, M. and McDevitt, H. O.: *J. Immunol.*, **163**(11), 6275-82 (1999).
- 93) Boyton, R. J., Lohmann, T., Londei, M., Kalbacher, H., Halder, T., Frater, A. J., Douek, D. C., Leslie, D. G., Flavell, R. A. and Altmann, D. M.: *Int. Immunol.*, **10**(12), 1765-76 (1998).
- 94) Patel, S. D., Cope, A. P., Congia, M., Chen, T. T., Kim, E., Fugger, L., Wherrett, D. and Sonderstrup-McDevitt, G.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**(15), 8082-7 (1997).
- 95) Shirai, M., Arichi, T., Nishioka, M., Nomura, T., Ikeda, K., Kawanishi, K., Engelhard, V. H., Feinstone, S. M. and Berzofsky, J. A.: *J. Immunol.*, **154**(6), 2733-42 (1995).
- 96) Ottesen, J. L., Nilsson, P., Jami, J., Weilguny, D., Duhrkop, M., Bucchini, D., Havelund, S. and Fogh, J. M.: *Diabetologia*, **37**(12), 1178-85 (1994).
- 97) Palleroni, A. V., Aglione, A., Labow, M., Brunda, M. J., Pestka, S., Sinigaglia, F., Garotta, G., Alsenz, J. and Braun, A.: *J. Interferon Cytokine Res.*, **17**, Suppl 1 S23-7 (1997).
- 98) Stewart, T. A., Hollingshead, P. G., Pitts, S. L., Chang, R., Martin, L. E. and Oakley, H.: *Mol. Biol. Med.*, **6**(4), 275-81 (1989).
- 99) Hermeling, S., Schellekens, H., Maas, C., Gebbink, M. F., Crommelin, D. J. and Jiskoot, W.: *J. Pharm. Sci.*, **95**(5), 1084-96 (2006).
- 100) Basu, A., Yang, K., Wang, M., Liu, S., Chintala, R., Palm, T., Zhao, H., Peng, P., Wu, D., Zhang, Z., Hua, J., Hsieh, M. C., Zhou, J., Petti, G., Li, X., Janjua, A., Mendez, M., Liu, J., Longley, C., Zhang, Z., Mehlig, M., Borowski, V., Viswanathan, M. and Filpula, D.: *Bioconjug. Chem.*, **17**(3), 618-30 (2006).
- 101) Traggiai, E., Chicha, L., Mazzucchelli, L., Bronz, L., Piffaretti, J. C., Lanzavecchia, A. and Manz, M. G.: *Science*, **304**(5667), 104-7 (2004).
- 102) Choi, B. K., Joo, S. Y., Moon, C., Park, K. S., Kim, S. H., Park, J. B., Jung, G. O., Choi, G. S., Kwon, C. H., Chun, J. M., Joh, J. W., Lee, S. K. and Kim, S. J.: *Transplant. Proc.*, **40**(8), 2655-60 (2008).
- 103) Shultz, L. D., Lyons, B. L., Burzenski, L. M., Gott, B., Chen, X., Chaleff, S., Kotb, M., Gillies, S. D., King, M., Mangada, J., Greiner, D. L. and Handgretinger, R.: *J. Immunol.*, **174**(10), 6477-89 (2005).
- 104) Giassi, L. J., Pearson, T., Shultz, L. D., Laning, J., Biber, K., Kraus, M., Woda, B. A., Schmidt, M. R., Woodland, R. T., Rossini, A. A. and Greiner, D. L.: *Exp. Biol. Med. (Maywood)*, **233**(8), 997-1012 (2008).

## 治療用タンパク質の免疫原性 その3†

新見 伸吾<sup>\*1</sup>, 原島 瑞<sup>\*2</sup>, 日向 昌司<sup>\*1</sup>, 川崎 ナナ<sup>\*1</sup>

治療用タンパク質の免疫原性 その3<sup>†</sup>新見 伸吾<sup>\*1</sup>, 原島 瑞<sup>\*2</sup>, 日向 昌司<sup>\*1</sup>, 川崎 ナナ<sup>\*1</sup>

(受付:平成22年5月10日, 受理:平成22年7月20日)

Immunogenicity of Therapeutic Proteins Part 3<sup>†</sup>Shingo NIIMI<sup>\*1</sup>, Mizuho HARASHIMA<sup>\*2</sup>, Masashi HYUGA<sup>\*1</sup> and Nana KAWASAKI<sup>\*1</sup>

## はじめに

現在, 世界では200以上の高度に精製された治療用タンパク質が医療現場に提供されており, その75%がヒト型組換えタンパク質である<sup>1)</sup>. これら治療用タンパク質のほとんどは, ヒト体内で産生されるタンパク質と同じアミノ酸配列を有するが, 患者で抗体の産生が誘導されることが報告された<sup>2-5)</sup>. 一般的に, 抗原の抗体産生や細胞性免疫を誘導する性質を免疫原性と呼ぶ. 本稿において, 免疫原性とは, タンパク質治療薬を患者に投与した場合, その治療薬に対する特異的な抗体産生が誘導される性質を指す. なお, 以下に示す治療用タンパク質は特に記載しない場合はヒト型組換えタンパク質を示す.

抗体の検出される頻度及び有害事象は製品により異なる. 産生される抗体が非中和抗体の場合, 抗体の出現は一過性であり, 有害でないことが多い. また, ほとんどの製品において, 有害な抗体反応により影響を受ける患者の数は, 治療患者全体のごく一部である<sup>6)</sup>. しかし, 特に中和抗体の場合は有効性が低下し, 臨床結果に悪影響を及ぼす可能性が高い. 場合によっては, 抗体産生の誘導により, 治療薬だけでなく内在性タンパク質が不活性化され, 重篤な有害事象を及ぼす例も報告されている<sup>2,7)</sup>. したがって, 免疫原性は規制当局, 製薬会社, 医師, 患者にとって大きな安全性及び有効性に関する懸念となっている.

一方, タンパク質治療薬を開発する場合, 免疫原性のリスク評価法として, T細胞エピトープの*in silico*予測方法, HLA結合アッセイ, T細胞を用いた*in vitro*のアッセイ, HLAトランスジェニックマウスなどが開発されている<sup>8)</sup>. しかし, これらの方法はあくまでも免疫原性の予測方法に過ぎず, その結果は臨床において実際に観察される免疫原性と必ずしも一致しない場合もある.

したがって, 免疫原性については, 最終的に臨床において測定し, その結果に基づいて適切な対策を講じることが現実的な対応となっている. このような観点から, わが国をはじめ, 欧州, カナダ, オーストラリア, 米国の規制当局は免疫原性を評価し, 薬理学的及び毒性学的な所見との相関を調べるように要求している<sup>9-11)</sup>.

本稿では治療用タンパク質に対する抗体価の測定方法の原理及び特徴, 抗体活性の測定系の構築において特に留意すべき点, IFN- $\beta$ , エリスロポエチン及びパニツプマブに対して患者で産生が誘導された抗体の測定の現状と問題点について概説する. なお, 免疫原性の高まる要因及び治療用タンパク質において抗体産生が誘導された例の詳細については著者等の総説を参考にされたい<sup>12)</sup>.

<sup>†</sup> その1: 医薬品研究, 40(11), 703~715 (2009), 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)

<sup>\*1</sup> 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部 東京都世田谷区上用賀 1-18-1 (〒158-8501)  
Division of Biological Chemistry and Biologicals, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

<sup>\*2</sup> 日本大学総合科学研究所 東京都千代田区五番町 12-5 (〒102-8251)  
University Research Center, NIHON UNIVERSITY, 12-5 Gobancho, Chiyoda-ku, Tokyo 102-8251, Japan

## 1. 結合アッセイ

### 1.1 結合アッセイの方法

治療用タンパク質と結合する抗体の存在は結合アッセイ (binding assay) を用いて測定できる。結合アッセイは後述する中和抗体の試験を行う前のスクリーニングとして多くの場合に用いられる。結合アッセイとしては enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)、放射免疫沈降法、表面プラズモン共鳴、フローサイトメトリーを基にした免疫アッセイが主なものである。これらの方法で注意すべき点は、結合能を有するすべての抗体を検出できるが、検出された抗体の中和能の有無については判断できないことである。以下にこれらの結合アッセイの原理及び特徴について概説する。なお、本項は成書等を参考にした<sup>13~16)</sup>。

#### 1.1.1 ELISA

ELISA は主に直接法とブリッジング法が用いられる<sup>17~20)</sup>。直接法では抗原をプレートに固定し、これに抗体を含む血清サンプルを加える。結合抗体は通常ヤギ抗ヒト Ig 抗体のような酵素標識二次抗体と結合させ、最終的に加えた基質の酵素反応による発色により抗体を検出する。本法では血清サンプル中の非特異的な免疫グロブリンの抗原への結合によりバックグラウンドが高くなる可能性がある。ブリッジング法では酵素標識二次抗体の代わりに酵素標識抗原を用いる。本法は IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub> に存在する二つの一価の Fab 部位 (抗原結合部位) を介して、プレートに結合した抗原、抗体、酵素標識抗原のブリッジが形成されることに基づく。この3者の結合により検出の特異性が増加する。なお、IgG<sub>4</sub> の場合は、二つの異なる IgG<sub>4</sub> の間で重鎖と軽鎖の一つのペアが交換反応を起こすため、得られた IgG<sub>4</sub> は二つの異なる Fab 部位を有することになる<sup>21)</sup>。したがって、交換反応後の IgG<sub>4</sub> では本来有していた一価の Fab 部位は一つしか存在しないため、ブリッジング法を用いることができない。どちらの方法も抗原をプレートに固定する際に抗原の変性が起こり、変性前の構造にのみ存在するエピトープを認識する抗体は検出されない場合がある<sup>13, 19, 22, 23)</sup>。また、結合親和性の低い抗体は洗浄時に除かれ検出されない可能性がある。しかし、高感度で測定は容易であり、比較的多くのサンプルを一度に測定できるためスクリーニングのアッセイとしては適している。

#### 1.1.2 放射免疫沈降法

本法では抗体を以下のような原理で測定する<sup>24)</sup>。溶液中で抗体と放射能標識した抗原を結合させ、その複合体をプロテイン A あるいはプロテイン G を固定化したビーズと結合させる。抗体の検出は遠心して沈殿における

放射能のカウントの測定により行う。本法では溶液中で抗原と抗体を結合させるため、本来の構造を有する抗原に対する抗体を検出でき、かつ高感度である。一方、放射能を取り扱うため、実施できる施設に限られる。また、大量処理が困難で、プロテイン A は IgG<sub>3</sub> と IgM、プロテイン G は IgM を、それぞれ結合できないため検出ができない。それを防ぐために、ゲルろ過により未結合の放射能標識した抗原と複合体を分離する場合もある。

#### 1.1.3 フローサイトメトリーによる結合アッセイ

本法では抗体を以下のような原理で測定する<sup>17)</sup>。溶液中でビーズに抗原を結合させ、これに抗体を加える。抗体に蛍光標識した二次抗体あるいは抗原と結合させフローサイトメーターにより検出する<sup>17)</sup>。本法では、抗原だけでなく陰性コントロールあるいは関連分子を結合させたビーズを混ぜることにより、特異性及び他の分子との交差反応性を容易に測定できる<sup>25, 26)</sup>。一方、ELISA と同様に結合親和性の低い抗体は洗浄の際に除かれ検出されない可能性がある。

#### 1.1.4 表面プラズモン共鳴

本法は、表面プラズモンが金属/液体界面で励起した場合に起こる、いわゆる表面プラズモン共鳴の光学現象を利用している。センサーチップの金薄膜とガラスの界面に、光を全反射するように照射すると、反射光の一部に反射光強度が低下した部分が観察される。この光の暗い部分の現れる角度が、センサーチップ表面の溶媒の屈折率に依存する。この屈折率変化を質量変化と捉えて、縦軸に質量変化、横軸に時間をとり、リアルタイムに相互作用測定をモニターする。例えば、センサーチップ表面に固定化した抗原に、抗体が特異的に結合すると、質量が増加した分シグナルは上昇し、抗原から抗体が解離し質量が減少すると、シグナルは下降する。よって、抗体の結合及び解離の速さを速度定数として求めることができ、相対的な親和性及びアイソタイプ同定のような詳細な特性解析が可能である。測定は自動化することができ、結果は数分で得られ、親和性の低い抗体を含めすべての結合可能な抗体が検出できる<sup>27, 28)</sup>。一方、高親和性抗体の場合、検出感度は ELISA よりも通常低い。

#### 1.1.5 抗原・抗体複合体の酸による解離を用いた結合アッセイ

2.2 のマトリックスの項で述べるが、血清サンプル中に患者に投与した治療用タンパク質が存在する場合、抗体と複合体を形成するため、結合アッセイの感度が低下する可能性がある。治療用タンパク質存在下における結合アッセイの感度を向上させるために、酸で抗原・抗体複合体を解離させた後に抗体を ELISA で測定する方法が開発された<sup>11)</sup>。酸解離法により治療用タンパク質によ

る干渉が低下し、100倍過剰量の治療用タンパク質（パニツムマブ、抗interleukin-1受容体モノクローナル抗体、ある種の治療用モノクローナル抗体）が存在しても測定が可能であったことが報告されている<sup>28-30)</sup>。同様な酸解離法の有用性が表面プラズモン共鳴法でも報告されている<sup>31)</sup>。本法の変法として抗体と抗原複合体を解離した後、親和性を利用して抗体を固相に結合し抗原を除く方法も開発されている<sup>32, 33)</sup>。

## 1.2 結合アッセイ系の構築において留意すべき点

抗体の結合アッセイにおいては特異性、選択性、カットオフポイントの設定、マトリックスの干渉、希釈直線性、精度、頑健性、ruggedness（施設間の研究により示されたアッセイの妥当性）が要求される。本項ではその中で特に重要と思われる特異性、マトリックスの干渉、カットオフポイントの設定について概説する。なお、その詳細及びその他の項目については成書<sup>13, 34, 35)</sup>を参考にされたい。

### 1.2.1 特異性

特異性とは、他のマトリックス構成成分の存在下において標的分析物を明白に検出する分析手法の性質である。標的分析物である治療用タンパク質に対する抗体はポリクローナル抗体であり、様々なアイソタイプ（クラス、サブクラス）、特性及び親和性を有する集団である。したがって、代表的な抗体を選択することが妥当性評価の過程において重要となる。アッセイ系の構築は通常臨床試験より先に行われるため、ヒトから抗体を入手することは一般的に困難である。したがって、動物を用いた毒性試験の過程で得られた抗体が有用となる場合がある。特異性は通常競合阻害試験（competitive inhibition test）により確認できる。なお、競合阻害試験では、治療用タンパク質の存在下及び非存在下でサンプルをあらかじめインキュベーションする。その後の抗体の結合アッセイにおいて、抗体の結合シグナルが治療用タンパク質の存在により低下する場合には、特異性が確認される。

### 1.2.2 マトリックスの干渉

マトリックスとは治療用タンパク質に対する抗体が存在する血清、血漿のようなサンプルに含まれる、目的とする抗体以外の成分を指す。マトリックスには治療用タンパク質が含まれている可能性があるだけでなく、多量のタンパク質及び脂質などが含まれているため、抗体の結合アッセイを妨害する可能性を考慮する必要がある。抗体の結合アッセイを妨害する可能性が高いマトリックスが存在するサンプルを含む陽性コントロール抗体におけるアッセイシグナルを、治療用タンパク質が投与されていない患者からの抗体の結合アッセイを妨害する可能

性が低いマトリックスが存在するサンプルに添加した陽性コントロール抗体のアッセイシグナルで割り、回収率を解析することによりマトリックス干渉を評価できる。干渉物質が特定の群あるいは特定の疾患と関連する可能性がある場合は、正常及び疾患状態の治療用タンパク質が投与されていないヒトに由来するサンプルもアッセイ系で評価する必要がある。溶血サンプルあるいは高脂血サンプルの場合は、溶血により漏出した赤血球内の成分及び高濃度の脂質もマトリックスに含まれる。通常最大回収率の差が20%以内であれば、許容範囲と考えられるが、用いる陽性コントロール抗体によりその値は変動しうる。

抗治療用タンパク質抗体における干渉の主なものは治療用タンパク質そのものである。治療用タンパク質は既に抗体と結合しているかあるいは結合アッセイにおいて競合し、シグナルを低下させる可能性がある。治療用タンパク質が抗体の結合アッセイを干渉するかどうかは、治療用タンパク質の血中における存在量に依存する。その血中存在量は、最後に投与してからサンプルを回収するまでの期間及び治療用タンパク質の薬物動態学的プロファイルにより影響を受ける。モノクローナル抗体治療薬の場合は半減期が長い場合、特に干渉が懸念される。

干渉は一定の濃度の陽性コントロール抗体に治療用タンパク質の量を変えてあらかじめインキュベーション後、アッセイを行うことにより評価できる。しかし、干渉の程度は用いる陽性コントロール抗体の親和性に強く依存し、高親和性の場合にはシグナルが低下するが、低親和性の場合にはシグナルが低下しない場合がある。抗体の親和性は個人により異なるので、陽性サンプルを用いた場合とその結果は必ずしも一致しない場合もある。

### 1.2.3 カットオフポイントの設定

カットオフポイントとは、陽性あるいは陰性を判断するための境界値である。すなわち、カットオフポイントより高値の場合は陽性、低値の場合は陰性と判定される。免疫原性の評価に対するリスクに基づく、中和抗体のカットオフポイントについては、偽陽性がある場合は、陽性ではなく偽陽性について設定された中和抗体のカットオフポイントに基づき、真の陽性患者をできるだけ見逃さないように検出する必要がある。カットオフポイントは薬物未投与群、望ましくは標的疾患あるいは標的疾患モデル動物からのサンプルの解析により設定することが望まれる。これらの試料を得ることが困難な場合は、健常ドナーサンプルも使用できる。測定値の分布が正常な分布曲線と合致するならば、すべての薬物未投与群サンプル試験の結果の平均値と標準偏差の1.645倍をカットオフポイントとして定義する。この設定により、統計



的には薬物未投与群の5%が偽陽性となりうる。サンプルの陽性あるいは陰性の最終決定には、先に述べた治療用タンパク質を用いた競合実験を行うことで、偽陽性の最終出現率をはるかに少なくすることが可能である。

## 2. 中和抗体のアッセイ

### 2.1 中和抗体のアッセイ方法

培養細胞を用いた中和抗体アッセイは、結合抗体のうち中和抗体のみを測定できる唯一の方法であることを最大の長所とする。中和抗体は、抗体による治療用タンパク質の生物活性の低下により検出する。治療用タンパク質の生物活性はそれぞれ異なり、適切な測定指標を設定する必要がある。一般的に、アッセイ系における変動が大きく、結果が得られるまで数日かかる。また、後述するように測定系が血清のマトリックスに影響を受けやすい。

培養細胞を用いた中和抗体のアッセイは直接アッセイと間接アッセイに分けられる。直接アッセイの場合、治療用タンパク質の例としてはホルモン及びサイトカインのような直接細胞に作用を示すものである。その場合中和抗体の作用は例えば、サイトカインによる増殖促進効果の阻害である。間接アッセイの場合、治療用タンパク質の典型的な例は増殖因子あるいはその受容体に対するモノクローナル抗体である。可溶性受容体、受容体のアンタゴニストもこの中に含まれる。例えば、治療用タンパク質が増殖因子に対する抗体の場合、増殖因子による増殖促進が治療用タンパク質により阻害されるが、これに対し抗治療用タンパク質抗体は治療用タンパク質による細胞増殖阻害作用から回復させる。

### 2.2 中和抗体のアッセイ系の構築において留意すべき点

培養細胞を用いた中和抗体のアッセイ系を構築するうえで留意すべき点については先に述べた結合アッセイと基本的に同様である。本項ではその中で特に重要と思われるマトリックスの干渉、カットオフポイントについて概説する。その詳細及びその他の項目については文献<sup>36)</sup>を参考にされたい。

#### 2.2.1 マトリックスの干渉

細胞を用いたアッセイの性能は培地に添加した試験用の血清により影響される場合がある。例えば、血清のマトリックスに存在する因子の細胞に対する直接作用あるいは治療用タンパク質との相互作用により細胞の反応性が影響を受け、中和抗体アッセイ系の特異性が低下する可能性がある。したがって、マトリックス干渉がアッセイ

系に及ぼす影響について以下のような方法を用いて評価する必要がある。

#### 2.2.2 対象となる治療用タンパク質と同様な作用を示す他の因子を用いたアッセイ

このアッセイは、治療用タンパク質に対する反応が血清サンプルにより阻害された場合、治療用タンパク質と同様な作用を示すサイトカイン、成長因子、ホルモンなどのような他の因子の作用を調べ、阻害作用が抗体に特異的であるか否かの評価に用いる。例えば、中和抗体を含むサンプルがその他の因子による誘導を阻害しない場合、反応の阻害は血清サンプルに含まれるマトリックスの細胞毒性によるものではなく、治療用タンパク質に特異的であることが示される。一方、その他の因子による誘導も阻害する場合、細胞毒性を示す成分の存在を示唆し、偽陰性の可能性が高い。偽陰性であるかどうかは以下に述べる免疫枯渇アッセイ (immunodepletion assay) により確認できる。なお、免疫枯渇アッセイとは、後述するように抗体を吸収・吸着により除いたサンプルを用いたアッセイを指す。

#### 2.2.3 治療用タンパク質を添加しないで患者の血清サンプルを用いたアッセイ

このアプローチはアンタゴニストとして作用する抗体医薬品のような治療用タンパク質の中和抗体アッセイの場合に特に有効である。例えば、サイトカインによるシグナルの誘導の抗体医薬品による抑制が血清サンプルにより回復された場合、その回復が中和抗体あるいは患者の血清におけるサイトカインのレベルの増加のどちらによるものかの評価に用いる。例えば、本アッセイにおいて、抗体医薬品を添加しないで血清サンプルのみでサイトカインによるシグナルが誘導された場合は、その回復は中和抗体による抗体医薬品の中和によらないことが示され、偽陰性の可能性が高い。

#### 2.2.4 免疫枯渇アッセイ

このアッセイにおいては試験サンプルをプロテイン A、プロテイン G、プロテイン Lなどをコンジュゲートしたレジンで処理し抗体を除いたものと未処理のサンプルで試験する。この前処理により阻害サンプルから中和活性が除かれた場合、中和活性が抗体によることを示すことができる。このアッセイは上記二つのアッセイの適用が困難な場合そして偽陽性及び偽陰性の比率が高い場合の評価に有用である。注意すべき点は、1.1.2 放射能免疫沈降法で述べたように、プロテイン A とプロテイン G の各免疫グロブリンに対する結合能の有無である。なお、プロテイン L は IgG<sub>3</sub> と IgM を結合できる。

#### 2.2.5 免疫競合アッセイ

このアッセイでは試験サンプルに治療用タンパク質を

添加して中和抗体に結合させた後、マトリックス干渉アッセイを行う。この場合、あらかじめ試験サンプルに添加する治療用タンパク質は、その中に含まれる抗体のすべてに結合し、治療用タンパク質の量を横軸にその治療用タンパク質が及ぼす作用の強さを縦軸に取った用量反応曲線において、最大の反応性が得られる量を用いる必要がある。この条件において干渉効果が得られる場合は、中和抗体以外のマトリックス成分によることが示される。なお、用量反応曲線において低い反応性を示す量の治療用タンパク質を用いる場合は、干渉効果がみられた場合に、その原因が中和抗体あるいは他のマトリックス成分のどちらであるか特定することが困難であり、実験条件として適切ではない。

## 2.3 カットオフポイントの設定

### 2.3.1 ブランクドナー血清

カットオフポイントの設定には、治療用タンパク質を投与していない健康人あるいは当該疾患の患者の血清を用いる。カットオフポイントは適切なパラメトリック又は非パラメトリック統計アプローチを用い、片側95%予測区間の上限を用いて設定できる。これら血清サンプルで値の変動が大きい場合、アッセイの感度が確保される範囲内でサンプルを希釈して用いることが望まれる。これらの処置によっても値の変動が大きい場合は、棄却検定により異常値を除去し、偽陽性及び偽陰性の数を減らすように適切なカットオフポイントを設定する必要がある。

### 2.3.2 抗体スパイク有無のブランクドナー血清の比

先に述べた血清サンプルの希釈によっても、ドナー間で値が変動する場合は以下のような方法を用いることができる。1.5から2倍の濃度で治療用タンパク質による反応の抑制が見られる濃度の陽性コントロール抗体を添加したドナー血清と添加していない血清で中和抗体アッセイを行う。スパイク前後の比の片側95%予測区間の低い限界値をカットオフポイントとして用いることができる。

## 3. 治療用タンパク質に対する患者血清抗体価の測定例

本項では患者において産生が誘導された治療用タンパク質に対する抗体を、様々な結合アッセイ及び中和抗体アッセイにより測定した代表的な例として、IFN- $\beta$ 、エリスロポエチン、パニツムマブに対する抗体について概説する。その他の例については成書など<sup>14, 37-42)</sup>を参考にされたい。

## 3.1 IFN- $\beta$ に対する抗体の結合アッセイ及び中和抗体のアッセイ

IFN- $\beta$ は再発寛解型多発性硬化症の治療に広く用いられている<sup>43)</sup>。しかし、長期間治療を受けた患者の一部でIFN- $\beta$ の生物活性を妨害する中和抗体が出現する<sup>44, 45)</sup>。その結果、IFN- $\beta$ の活性の低下によりIFN- $\beta$ の有効性が低下し、その後病状が悪化する<sup>46-49)</sup>。そのため、抗体の存在を患者で定期的にモニタリングすることが重要であり、様々な結合アッセイ及び中和抗体アッセイが開発されている。

### 3.1.1 IFN- $\beta$ に対する抗体の結合アッセイ

IFN- $\beta$ に対する結合抗体のアッセイとして、ウェスタンブロット法、直接ELISA、放射免疫沈降法、ブリッジELISAが検討された。その結果、ウェスタンブロット法と直接ELISAは偽陰性及び偽陽性の起きる率が高いため、欧州神経学会により不適当と判断された<sup>50)</sup>。放射免疫沈降法は、後述するA549細胞を用いたIFN- $\beta$ によるMyxovirus resistant protein A (MxA)の誘導を用いた中和抗体アッセイよりも感度が高く、より多くの陽性を検出できた<sup>51)</sup>。直接ELISAでは、後述する細胞変性アッセイを用いた中和抗体アッセイで陽性と判断された58サンプルのうち10サンプルが陰性と判定されたのに対し、ブリッジELISAではすべて陽性と判定された<sup>52)</sup>。また、ブリッジELISAで高いかあるいは非常に高い値を示すサンプルのみが細胞変性アッセイで陽性と判定された。このような妥当性により、ブリッジELISAと放射免疫沈降法は中和抗体を測定する前のIFN- $\beta$ の抗体スクリーニングとして推奨されている。

### 3.1.2 IFN- $\beta$ に対する抗体の中和抗体アッセイ

#### 3.1.2.1 細胞変性アッセイ

IFN- $\beta$ に対する中和抗体を検出する代表的な標準法は細胞変性アッセイであり、ウイルスによる細胞変性をIFN- $\beta$ が抑制する原理に基づいている。本法はWHOにより推奨されており<sup>53)</sup>、現在最も共通に用いられている<sup>54)</sup>。WHOはヒト肺がん細胞(A549細胞株)と脳心筋炎ウイルスの使用を推奨している<sup>53)</sup>。一方、Wistar Institute Susan Hayflic (WISH)細胞株とシンドビスウイルスの組み合わせ<sup>55)</sup>及びWISHと水疱性口内炎ウイルスの組み合わせ<sup>48, 56-59)</sup>も使用されている。細胞変性アッセイでは、IFN- $\beta$ の濃度を一定にして血清を希釈して試験するように推奨されている<sup>50)</sup>。一方、血清を例えば、20倍のように一定に希釈し、IFN- $\beta$ の濃度を変動させて試験を行うことにより、感度を10から20倍増加できるという報告もある<sup>60)</sup>。細胞変性アッセイの長所は非常に感度が高いことである。しかし、以下に述べるように様々

な問題もあり、次項で述べるバイオマーカーの定量を用いたアッセイ系の研究が精力的に行われている。①ウイルスを取り扱うため実験者に対して安全性の懸念が生じる。②IFN- $\beta$  に特異的ではないので、血清中に IL-6 あるいは IFN- $\gamma$  のような抗ウイルス活性を示す物質の存在により、ウイルスによる細胞変性効果が抑制される。③血清サンプル中に可溶性 IFN- $\beta$  受容体が高濃度存在する場合、IFN- $\beta$  と結合し、中和抗体が存在する場合と同様に IFN- $\beta$  によるウイルスによる細胞変性効果の抑制が低下する<sup>61)</sup>。④血清サンプル中の中和抗体により抗 IFN- $\beta$  活性は用いる細胞及びウイルスの種類、インキュベーション時間、洗浄ステップにより変動するため、施設間における値の変動は大きく、その比較は困難である<sup>62)</sup>。⑤操作が煩雑で測定まで4日を要する。⑥中和抗体のタイター（抗体価）と IFN- $\beta$  の有効性の低下との関連については不明の点が多い<sup>63, 64)</sup>。

### 3.1.2.2 バイオマーカーの定量

Neopterin, 2'-5' oligoadenylate synthetase,  $\beta$ -2 microglobulin, MxA のような IFN- $\beta$  に誘導される遺伝子とそのタンパク質は、IFN- $\beta$  で治療した患者における抗体の中和抗体アッセイの測定指標として用いられている<sup>65-69)</sup>。特に MxA は 1 型 IFN である IFN- $\alpha$  及び IFN- $\beta$  により特異的に誘導されるため、多くの検討が行われている。

培養細胞における IFN- $\beta$  による通常 24 時間後の MxA タンパク質の誘導、中和抗体による抑制が ELISA により測定されている<sup>70-72)</sup>。本法における結果は細胞変性アッセイの結果と相関があり<sup>71, 72)</sup>、細胞変性アッセイよりも感度が高く、検出できる抗体のタイターの範囲は約 7 倍広い<sup>72)</sup>。MxA 以外に IFN- $\beta$  により誘導される遺伝子あるいはその遺伝子のプロモーターを用いたレポーターアッセイが中和抗体アッセイとして用いられている。A549 細胞において IFN- $\beta$  により誘導される 6~16 タンパク mRNA レベルの中和抗体による抑制が調べられた<sup>73)</sup>。その結果、6~16 mRNA の IFN- $\beta$  による誘導は 4 時間で測定可能であり、中和抗体のタイターは細胞変性アッセイの結果と良く一致した。6~16 遺伝子のプロモーターをルシフェラーゼ遺伝子に連結させたプラスミドをヒト線維肉腫細胞株 HT1080 細胞株に導入し、IFN- $\beta$  によるルシフェラーゼ遺伝子発現の中和抗体による抑制が細胞変性アッセイと比較された<sup>74)</sup>。その結果、ルシフェラーゼアッセイにより測定した中和抗体のタイターは細胞変性アッセイにより測定したタイターと良く一致した。

患者における IFN- $\beta$  の投与による MxA タンパク質の誘導が、末梢血液単核球あるいは血液サンプルを用いてフローサイトメトリーあるいは ELISA で測定されてい

る<sup>58, 75)</sup>。フローサイトメトリーを用いたアッセイでは、細胞変性アッセイで中和抗体陽性の患者 9 人のうち 7 人で MxA タンパク質が誘導されず、細胞変性アッセイによる中和抗体のタイターと MxA タンパク質発現レベルには負の相関関係があった<sup>58)</sup>。ELISA とフローサイトメトリーを用いたアッセイでは、患者 51 人のうち 13 人が中和抗体陽性と判定され、そのうち 9 人で MxA タンパク質が誘導されなかった<sup>75)</sup>。MxA タンパク質は細胞において非常に安定で、IFN- $\beta$  投与後 24~48 時間後にそのタンパク質レベルは最大に達する<sup>76)</sup>。したがって、本法では偽陰性の生じる可能性が低く、血液サンプリングも IFN- $\beta$  投与前と投与後一日あるいは二日後の適当な時間に行うことができる。したがって、患者の通院に対する時間的な制約が少なくてすむ。

患者における IFN- $\beta$  の投与による MxA mRNA の誘導が、患者の末梢血液単核球あるいは血液サンプルを用いてリアルタイム RT-PCR で測定されている<sup>63, 77-79)</sup>。患者に IFN- $\beta$  を投与 12 時間後に血液単核球あるいは血液から RNA を抽出し MxA mRNA の発現が調べられた<sup>77)</sup>。その結果、54 人の患者のうち 7 人で MxA mRNA の発現が IFN- $\beta$  を投与していない健常者と同じレベルであり、IFN- $\beta$  に不応答性と判断された。また、これらの患者の結合抗体及び中和抗体のタイターは高かった。同様な検討が様々なタイターの中和抗体の患者で行われた<sup>78)</sup>。その結果、両者の値の比較により中和抗体のレベルは、IFN- $\beta$  に応答性、応答性が顕著に低下、不応答性の三つに分けられることが示された。患者において IFN- $\beta$  による MxA mRNA の発現誘導及び細胞変性アッセイによる中和抗体が測定され、その後の無再発生存率と死亡時期が比較された<sup>80)</sup>。MxA mRNA 発現陰性の患者は陽性の患者に比べて無再発生存率が低かった。同様な結果が中和抗体においても見られたが、死亡時期は MxA mRNA 発現陰性の患者のほうが 1 か月早く、MxA mRNA のほうが予測に若干優れていることが示された。IFN- $\beta$  投与後 MxA mRNA レベルは 13 時間でピークに達しその後低下するため<sup>81)</sup>、上記の知見は同様な時間の測定により得られている。

このように、IFN- $\beta$  投与 12 時間後に採血のため患者が再度通院することは患者にとって負担となる。そこで IFN- $\beta$  投与 4 時間で同様な検討が行われた<sup>79)</sup>。その結果、中和抗体のタイターと MxA mRNA の発現レベルに良い相関関係がみられた。更に、MxA mRNA の発現を IFN- $\beta$  投与前後で測定して誘導率で示すと、投与後のみの測定及び細胞変性アッセイで陰性と判定された患者 2 人が陽性と判定され、偽陰性の数を減らすことができた。

このように、患者に IFN- $\beta$  を投与後血液における MxA

mRNA あるいはタンパク質を測定することにより、患者において投与した IFN- $\beta$  の生物活性を直接測定できる。したがって、中和抗体が患者における IFN- $\beta$  の生物活性に及ぼす影響について、細胞変性アッセイあるいは他の細胞を用いたアッセイよりもより正確に測定できる可能性がある。今後、本法は中和抗体により IFN- $\beta$  に対する応答性が顕著に低下した患者の判定に特に有用となるかもしれない。

### 3.2 エリスロポエチンに対する抗体の結合アッセイ及び中和抗体のアッセイ

エリスロポエチンは腎性貧血治療患者の治療などに幅広く使用されているが、それに対する中和抗体の出現が原因で生じる赤芽球癆は非常にまれな合併症であった<sup>82,83</sup>。しかし、ある特定のエポエチンアルファ製剤である Eprex<sup>®</sup> で治療した慢性腎不全の患者で赤芽球癆の例数が劇的に増加した<sup>7,84</sup>。そこで、赤芽球癆を併発した患者におけるエリスロポエチンに対する抗体が以下に示すように様々な方法で測定されている。

#### 3.2.1 エリスロポエチンに対する結合抗体のアッセイ

赤芽球癆患者血清における結合抗体がブリッジング ELISA 法、放射免疫沈降法、表面プラズモン共鳴法により調べられた<sup>85</sup>。その結果、調べた患者 8 人のすべてで放射免疫沈降法及び表面プラズモン共鳴では陽性であったが、2 人はブリッジング ELISA 法では陰性であった。他の施設で同血清サンプルを含む赤芽球癆患者 13 人の血清サンプルが放射免疫沈降法により調べられた結果、すべて陽性であった<sup>7</sup>。また、プロテイン A を用いた放射免疫沈降法と表面プラズモン共鳴で、抗体の相対濃度が良く一致した。これらの結果、患者の臨床所見及び後述する細胞を用いた中和抗体のアッセイの結果<sup>7,85</sup> から、ブリッジング ELISA 法における陰性は偽陰性と考えられる。ブリッジング ELISA 法で陰性を示した理由については明らかではないが、親和性が低い場合操作中の洗浄の過程で除かれた可能性が考えられる。表面プラズモン共鳴法で抗体のアイソタイプを調べると、IgG<sub>1</sub> と IgG<sub>4</sub> が主で IgG<sub>3</sub> の存在量は少なく、IgM は検出されなかった<sup>85</sup>。この抗体のアイソタイプの測定結果は以下の点で興味深い。まず、IgM が検出されなかったことは、サンプルを採取した時点で患者の免疫応答が成熟化しており、赤芽球癆が抗体によるエリスロポエチンの中和反応により起こったことを示す。次に、IgG<sub>3</sub> の存在量が少なく IgM が検出されなかったことは、先に述べたように放射免疫沈降法で測定できない抗体が、血清にはほとんど存在していないことを示している。したがって、放射免疫沈降法と表面プラズモン共鳴法では、ほぼ同じアイソ

タイプの抗体が検出されることが予想され、両測定法で抗体の相対濃度が良い相関を示したと一致する。赤芽球癆患者血清における結合抗体がフローサイトメトリーによる結合アッセイにより測定された<sup>17</sup>。その結果、コントロールピーズを比較に用いた解析から、抗体はエリスロポエチンに特異的に結合し、抗体の相対濃度は表面プラズモン共鳴における値と相関することが示された。

#### 3.2.2 エリスロポエチンに対する中和抗体のアッセイ

エリスロポエチンに対する中和抗体のアッセイに用いる細胞としては、主に健常人の骨髄由来赤血球前駆細胞<sup>7</sup> 及びヒトエリスロポエチン受容体を導入した IL-3 依存的なマウスの 32D 細胞株<sup>86</sup> が用いられている。前者の細胞を用いたアッセイでは、エリスロポエチン依存的な赤血球コロニー形成促進の抗体による阻害を測定する。後者の細胞を用いたアッセイでは、エリスロポエチン依存的な増殖促進の抗体による阻害を測定する。先に示した赤芽球癆患者 13 人で前者の細胞を用いた中和抗体のアッセイの結果と放射免疫沈降法の結果が比較された<sup>7</sup>。その結果、中和抗体のアッセイの結果に基づき、中和抗体 13 検体を完全阻害と 50%以下の阻害の二つに分類すると、放射免疫沈降法の値は、完全阻害では 8 検体で 11~86 U/mL、各 1 検体で 6 U/mL 及び 4 U/mL であったのに対し、50%以下の阻害では 2 検体で 4 U/mL、1 検体で 3 U/mL であり、中和抗体の量と阻害の強さが全体的に良く一致した。先に示した放射免疫沈降法及び表面プラズモン共鳴により陽性と判定された八つのサンプルで中和抗体のアッセイが行われた<sup>85</sup>。その結果、相対抗体濃度は中和抗体のアッセイと結合抗体アッセイとで全体的に良く一致したが、一つのサンプルで中和抗体の値が低かった<sup>85</sup>。抗体はポリクローナルな集団であるため、このサンプルでは中和活性を持たない結合抗体の比率が高い可能性が考えられる。

### 3.3 パニツムマブに対する抗体の結合アッセイ及び中和抗体のアッセイ

パニツムマブはヒト epidermal growth factor receptor (EGFR) に対する高親和性完全ヒト IgG<sub>2</sub> モノクローナル抗体である。パニツムマブは標準的な抗癌剤治療実施後に転移した結腸・直腸癌の治療薬として有効であることが認められ<sup>87</sup>、2009 年米国、2010 年日本で承認された。

臨床試験においてパニツムマブによる抗体産生の誘導を評価するため、結合アッセイ及び中和抗体のアッセイが開発されている<sup>28</sup>。結合アッセイとしてはブリッジ ELISA と表面プラズモン共鳴が開発された。ブリッジ ELISA では抗体と結合したパニツムマブの干渉を防ぐために酸解離法が用いられている。また、中和抗体のバ